



Universitat de Lleida

Tractament dietètic de la resistència a la insulina amb compostos bioactius i els seus efectes en el mitocondri

Anna Casañé Riera

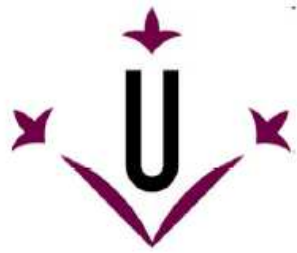
Dipòsit Legal: L.1699-2014

<http://hdl.handle.net/10803/285012>



Tractament dietètic de la resistència a la insulina amb compostos bioactius i els seus efectes en el mitocondri està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

(c) 2014, Anna Casañé Riera



Universitat de Lleida

Departament de Medicina
Experimental

Tractament dietètic de la resistència a la insulina amb compostos bioactius i els seus efectes en el mitocondri

Memòria presentada per:

Anna Casañé Riera

Per a optar al títol de Doctora per la Universitat de Lleida

Tractament dietètic de la resistència a la insulina amb compostos bioactius i els seus efectes en el mitocondri

Anna Casañé Riera

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. José Serrano Casasola i Dr. Reinald Pamplona Gras, del Departament de Medicina Experimental, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida i dins del programa d'Estudis Avançats en Ciències Biomèdiques.

Dr. José Serrano Casasola Dr. Reinald Pamplona Gras Anna Casañé Riera

Lleida, 2014

Aquest treball s'ha dut a terme a les instal·lacions de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida i de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida) en el grup de Fisiopatologia Metabòlica. La tesi ha estat realitzada amb el suport de la Fundació "la Caixa" amb un ajut per a personal predoctoral del IRBLleida i per la Universitat de Lleida a través d'un ajut per a estades en altres centres de recerca (anys 2012-2013) i finançada per:

- Ministerio de Economía y Competitividad amb la col·laboració del Grupo Leche Pascual. En el projecte "Resistencia a insulina. Efectos y mecanismos de acción de ingredientes alimentarios funcionales (CENIT)".
- Unió Europea en el programa INTERREG IVC. En el projecte "Platform for International Collaborative Knowledge on Food Improvement, Based on Ecological Resources (PICKFIBER)"
- Ministerio de Economía y Competitividad amb la col·laboració de la Sociedad GO FRUSELVA, S.L. En el projecte "Desenvolupament de noves metodologies i tecnologies emergents d'evidenciació de l'efectivitat d'aliments amb propietats en salut, per la reducció del risc en l'edat mitjana de vida."
- Ministerio de Economía y Competitividad amb la col·laboració de CNTA. En el projecte "Guia per a la sustentació de declaracions per a la salut en aliments: funció immune, cognitiva i síndrome metabòlica-INCOMES (INNPRONTA, CDTI)".

“Hi ha una força motriu més
potentosa que el vapor, l’electricitat
o l’energia atòmica. Aquesta força
és la voluntat”

Albert Einstein

Al papa i a la mama,

Al Manu i al Xavi,

Als padrins

AGRAÏMENTS

I per fi començo l'apartat dels agraïments! Això vol dir que un dels moments més esperats ha arribat! :D Aquesta última etapa d'escriure ha resultat dura, però alhora molt enriquidora i que compensa amb tots els bons moments viscuts durant el procés de la tesi. A més, de ben segur que no hauria aconseguit tot això sense l'ajuda de molta gent i que a continuació m'agradaria agrair.

Primer de tot voldria agrair als caps del laboratori de Fisiopatologia Metabòlica, Reinald Pamplona i Manel Portero, per oferir-me l'oportunitat de realitzar aquesta tesi i per haver-me acollit a aquesta gran família. Reinald moltes gràcies per animar-me en aquest procés, fer-me veure les coses d'una manera positiva i per recolzar-me. Manel moltes gràcies per haver-me fet un lloc en aquest laboratori, per la teva amabilitat i dedicació, perquè sempre has tingut una resposta a tots els dubtes que tenia i per haver-me involucrat en diferents tasques que m'han donat l'oportunitat d'aprendre molt i de sentir-me realitzada.

Tot seguit moltes gràcies al Jose! Perquè des del minut 0 has estat sempre bolcat a ajudar-me, a tenir paciència i a animar-me a seguir endavant. M'has transmès com és d'important fer la feina amb il·lusió i constància i que mai ens podem enfonsar perquè en un moment o altre arriba la recompensa. Moltes gràcies pel teu suport, per tot el que m'has ensenyat i perquè sense tu aquesta tesi no hauria estat possible.

A la Meri, perquè sempre hem estat juntes en aquest camí, moltes gràcies per la dedicació en ensenyar-me com moure'm en el laboratori, les experiències viscudes en els diferents treballs i per fer-me veure la part positiva de treballar amb els ratolinets. Perquè has estat allí tant en els bons i mals moments, animant-me sempre, buscant solucions a tot i tenint el teu recolzament. I del que més orgullosa em sento és que ha sorgit una gran amistat!

Agrair també a tota la resta de membres del laboratori de Fisiopatologia Metabòlica perquè tots m'heu influenciat molt positivament i m'heu animat en tot moment. A la M^aJosep, per sempre estar disposada a ajudar-me, animar-me

i mimar-me. Al Joan pels teus consells. Al David, per l'alegria que despertés, per la rialla de bon de matí i per estar disposat a solucionar qualsevol problema. A la Vicky i a la Mariona per preocupar-se i animar-me. A l'Alba i a la Rossanna per endinsar-me en aquest món de la cromatografia, per fer-ho molt amè i per sempre estar disposades a resoldre'm qualsevol dubte, sense oblidar les xarreres i els farts de riure que ens hem fet. Al Dani, per sempre estar disposat a ajudar, pels teus ànims i consells. Al Jordi, per animar-me en tot moment i pel bon rotllo. A l'Hugo, per tot l'esforç que has fet per mi, per la teva dedicació en llegir la tesi i per aquelles preguntetes que tant em feien pensar, per aquella abraçada quan més ho necessitava, per aquella empenta d'energia i per sempre estar allí per escoltar-me i donar-me bons consells. A l'Ana per les teves paraules de suport, per preocupar-te en cada moment, escoltar-me i animar-me. A l'Omar perquè despertés alegria, per sempre estar disposat a ajudar i a escoltar, pels teus bons consells que tant m'ajudaven a relativitzar les coses i per animar-me en que jo puc amb tot això. A la Núria, per animar-me, per fer-me veure que el final de la tesi arriba, per estar disposada a ajudar en qualsevol moment i per lo divertida que ets. A la Liliana per estar disposada a ajudar i per la teva ajuda amb els ratolins. Lucía per tot el que em vas ensenyar i tots els bons moments viscuts. A la Hellene, Camilla, Marta, Gemma per preocupar-vos en cada moment, per animar-me i pels farts de riure que ens em fet. Finalment, als que heu passat pel grup i gràcies a vosaltres m'he donat compte que ensenyant és quan més s'aprèn, moltes gràcies Anca, Carla, Georgina, Francesc, Guillermo, Irene, Quique, Marta, Marie, Pilar i Victor. I també a les noves incorporacions Lara, Pascual, Natalia, Laura, Èlia. En definitiva, a tots els que formeu o heu format part del grup **MOLTES GRÀCIES!**

També vull agrair al grup d'Aberdeen, al Colin i la Melissa per tenir l'oportunitat de treballar en el seu grup. Melissa, per tot el que m'has ensenyat, per la teva amabilitat, dedicació i paciència. També vull agrair a la Susanna i a l'Àngela per fer que l'estada fos d'allò més amena i divertida. Gràcies Susanna per fer-me sentir com una més al grup d'Aberdonian Immigrants! També vull agrair al Colm i a l'Andy per aquelles llargues converses amb anglès i per endinsar-me a aquesta gran i bonica cultura escocesa. Per últim agrair a la família que em va

acollir a Aberdeen al John, a l'Emily, al Pablo i a l'Ollie! Moltes gràcies per la vostra hospitalitat i per fer-me sentir com una més de la família!

A les nenes Lourdi, Saida i Macarena que amb elles vaig començar aquest gran viatge pel món de la nutrició i perquè encara ara seguim passant molts bons moments. Per les llargues xarreres, perquè de vegades solament ens entenem nosaltres del difícil que és fer-te un lloc en el món laboral, pels farts de riure, per animar-me en tot moment, per les escapades que continuem fent i perquè no importa el temps que estiguem sense veure'ns, que la cosa sempre segueix igual. Gràcies xurris!

Al Gus moltes gràcies per la teva dedicació amb la portada, per preocupar-te per mi i per aquesta alegria que desprends. A la Mònica, Rebeca, Núria i Anna per sempre animar-me a tirar endavant i fer-me veure que jo puc amb això i amb molt més! Per totes les hores de xarrera, per preocupar-se sempre i sobretot per aquesta gran amistat! A l'Héctor, per tot el teu suport i per estar sempre en els moments que més ho he necessitat! Moltes gràcies a tots!!!

També vull donar les gràcies a tots els que heu fet possible que els moments fora de la tesi fossin d'allò més desestressants i espectaculars! On m'oblidava de tot i on la principal preocupació era no poder parar de riure. Moltes gràcies als grallers d'Almacelles, a la Banda Retocada, al Club Almacelles Atlètica, al gimnàs Pac-Dom (Emili moltes gràcies per les teves paraules i escrits i que tant m'animaven!), a les classes relaxants de la Dolors, a l'escalada (moltes gràcies Edgar!), als Happys (pels soparets, xarreres i festa) i a les Pepi's Night (perquè sou estupendes, perquè ens ho passem genial i perquè l'energia mai s'acaba). Amb molts de vosaltres en els que hi ha una grandíssima amistat, que m'heu recolzat en aquest esforç i que m'animàveu quan semblava que m'anava a rendir.

Desitjo també expressar tot el meu agraïment a la meva família, pel seu recolzament incondicional al llarg d'aquest projecte. Moltes gràcies papa i mama, perquè heu set uns referents per mi, pel vostre suport incondicional, per l'educació que m'heu donat, per sempre escoltar-me, animar-me, per confiar en mi i per fer-me veure que al final tot arriba. Al Manu, per escoltar-me, animar-

me, donar-me bons consells i per fer-me veure que les coses no són tant complicades com me les faig i que “Perquè has de patir tant amb fer els agraïments si es poden fer amb tres paraules: TU, TOTS, TOTHOM”. Al Xavi, perquè sempre saps treure el “millor” de mi, però que en el fons ens estimem molt, moltes gràcies per la teva xispa i pels bons moments que ens fas passar a tota la família! A la Marta i a la Sara, per preocupar-se, animar-me i per tots els bons moments que hem passat. Al padrí Riera i a la padrina Pilar, per tot el carinyo que m'heu donat, per animar-me en tot moment i per sempre estar interessants en el que estava fent, ja que encara que no ho entenguéssiu em miràveu i m'escoltàveu amb uns ulls i unes orelles ben oberts! A la padrina Carme, per sempre estar disposada a escoltar-me i perquè d'ella he après lo important que és saber estimar, també al padrí Amadeu, perquè segur que si estigues ara mateix aquí estaria super orgullós de mi. A la Carme, per estar sempre disposada a ajudar, per fer-me veure les coses d'una manera positiva, per animar-me en qualsevol moment i per tot el teu suport. A l'Elsa, perquè ets com la meva germana petita, per sempre estar allí, per fer-me aixecar en els moments més difícils, per fer-me riure i passar molt bones estones. No acabaria mai d'agrair a tots els membres de la família, perquè tots heu aportat molt en mi i sempre heu estat interessats en el que estava fent! Moltes gràcies a tots els tiets, padrineta i cosins, ah! I no m'oblido de tu Perla! No puc acabar sense nombrar a la Montse Pujol, perquè sempre has set com una més de la família! En el teu suport incondicional i els teus consells i ànims! Perquè tu saps millor que ningú que és passar per aquest procés on sempre m'has dit que és pitjor una tesi que un part!

MOLTISSIMES GRÀCIES A TOTS!

ESTRUCTURA TESI

En aquesta tesi s'han estudiat quatre tractaments dietètics en la resistència a la insulina. A causa de la diversitat dels mecanismes d'acció de cada compost estudiat, s'ha trobat oportú la divisió de la tesi en quatre capítols que corresponen a cada tractament dietètic. En aquest sentit l'estructura de la tesi es detalla seguidament:

- Introducció general, en la que es fa una breu introducció de la síndrome metabòlica i la resistència a la insulina i la seva relació amb la funció mitocondrial.
- Materials i mètodes, el qual descriu els procediments comuns utilitzats en aquesta tesi.
- Resultats, que es divideixen en quatre capítols:
 - Efecte de l'adequació energètica. En aquest capítol hi ha un primer apartat on es mostren els resultats del model d'inducció de resistència a la insulina, el qual és el model utilitzat en els diferents tractaments. En el segon apartat es descriuen els resultats i discussió del tractament d'adequació energètica.
 - Efecte del tractament amb omega-3, fibra soluble i soja respectivament. Cada capítol té una introducció que relaciona la síndrome metabòlica i el nutrient a estudiar, així com els resultats i discussió propis de cada tractament estudiat.
- Discussió general, la qual relaciona els diferents mecanismes d'acció dels tractaments utilitzats en la insulinoresistència i la memòria metabòlica.
- Conclusions general i específiques que sintetitzen els resultats observats en els diferents tractaments.

RESUM

La síndrome metabòlica és una epidèmia creixent a tot el món i consisteix en un conjunt de factors de risc per a la malaltia cardiovascular i diabetis tipus 2. Es caracteritza per l'obesitat central, la hiperlipidèmia, la hipertensió i la resistència a la insulina; uns factors que estan vinculats amb els canvis de l'estil de vida de la població, causats pel consum de dietes hipercalòriques i d'un estil de vida sedentari.

Les primeres línies de tractament per reduir la síndrome metabòlica són l'adequació de la ingesta calòrica i l'activitat física. No obstant, aquestes recomanacions sovint són difícils d'aplicar i la incorporació de diferents compostos bioactius a la dieta podria ser una alternativa útil per al tractament de la síndrome metabòlica.

L'objectiu d'aquesta tesi ha estat avaluar l'efecte de la suplementació nutricional dels compostos bioactius omega-3 i fibra soluble i de la soja en paràmetres de resistència a la insulina, així com el seu potencial efecte en el metabolisme energètic i la memòria metabòlica, evidenciat per canvis en el mitocondri.

S'ha utilitzat un model animal de ratolí al qual se li ha induït una resistència a la insulina amb una dieta hipercalòrica. Posteriorment s'ha tractat amb els compostos citats prèviament en contextos de dietes normocalòriques o hipercalòriques.

Els resultats mostren que l'adequació energètica disminueix els paràmetres de risc estudiats relacionats amb la síndrome metabòlica. La suplementació amb els compostos bioactius en un context de dieta normocalòrica no ofereix un valor afegit en el tractament de la resistència a la insulina. No obstant, en un context de dieta hipercalòrica, l'addició dels compostos bioactius milloren els nivells de sensibilitat a la insulina de forma similar al tractament amb una dieta normocalòrica. Així mateix, l'addició dels compostos tant en un context de dieta normocalòrica com hipercalòrica, tendeixen a revertir els nivells en les proteïnes relacionades amb el mitocondri en comparació amb una dieta hipercalòrica. Tot i els canvis observats en relació amb la sensibilitat a la insulina i el mitocondri, la ingesta de soja i fibra soluble van incrementar alguns marcadors de dany oxidatiu proteic. Això suggereix que s'ha de tenir en compte els possibles efectes a llarg termini de la suplementació d'aquests compostos en situacions d'insulinorresistència.

De forma general, es pot concloure que els efectes que produeixen les dietes hipercalòriques en situacions d'insulinorresistència en el mitocondri i possiblement en el metabolisme, poden ser revertits. Aquest fet suggereix que el mitocondri té una capacitat d'adaptació en relació a l'energia disponible.

RESUMEN

El síndrome metabólico es una epidemia creciente en todo el mundo y consiste en un conjunto de factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular y la diabetes tipo 2. Se caracteriza por la obesidad central, la hiperlipidemia, la hipertensión y la resistencia a la insulina; unos factores que están vinculados con los cambios de estilo de vida de la población, causadas por el consumo de dietas hipercalóricas y de un estilo de vida sedentario.

Las primeras líneas de tratamiento para reducir el síndrome metabólico son la adecuación de la ingesta calórica y la actividad física. Sin embargo, estas recomendaciones a menudo son difíciles de aplicar y la incorporación de los diferentes compuestos bioactivos a la dieta podría ser una alternativa útil para el tratamiento del síndrome metabólico.

El objetivo de esta tesis ha sido evaluar el efecto de la suplementación nutricional de los compuestos bioactivos omega-3 y fibra soluble y de la soja en parámetros de resistencia a la insulina, así como su potencial efecto en el metabolismo energético y la memoria metabólica, evidenciado por cambios en la mitocondria.

Se ha utilizado un modelo animal de ratón al que se le ha inducido una resistencia a la insulina con una dieta hipercalórica. Posteriormente se ha tratado con los compuestos citados previamente en contextos de dietas normocalóricas o hipercalóricas.

Los resultados muestran que la adecuación energética disminuye los parámetros de riesgo estudiados relacionados con el síndrome metabólico. La suplementación con los compuestos bioactivos en un contexto de dieta normocalórica no ofrecen un valor añadido en el tratamiento de la resistencia a la insulina. No obstante, en un contexto de dieta hipercalórica la adición de los compuestos bioactivos mejoran los niveles de sensibilidad a la insulina de forma similar al tratamiento con una dieta normocalórica. Así mismo, la adición de compuestos bioactivos tanto en un contexto de dieta normocalórica como hipercalórica, tienden a revertir los niveles en las proteínas relacionadas con la mitocondria en comparación con una dieta hipercalórica. A pesar de los cambios observados en relación con la sensibilidad a la insulina y la mitocondria, la ingesta de soja y fibra soluble incrementaron algunos marcadores de daño oxidativo proteico. Esto sugiere que se debe tomar en cuenta los posibles efectos a largo plazo de la suplementación de estos compuestos en situaciones de insulinoresistencia.

De forma general, se puede concluir que los efectos que producen las dietas hipercalóricas en situaciones de insulinoresistencia en la mitocondria y posiblemente en el metabolismo, pueden ser revertidos. Este hecho sugiere que la mitocondria tiene una capacidad de adaptación en relación a la energía disponible.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is a worldwide growing epidemic which is established by a combination of cardiovascular disease and type 2 diabetes risk factors. Metabolic syndrome is characterized by central obesity, hyperlipidemia, hypertension and insulin resistance; factors that are related with changes in the population lifestyles, caused by the consumption of hypercaloric diets and sedentary lifestyle.

The first common treatment for reducing metabolic syndrome is the adjustment of calorie intake and physical activity. However, these recommendations are often difficult to apply and the addition of various bioactive compounds in the diet may be a useful alternative for the treatment of metabolic syndrome.

The aim of this thesis was to evaluate the effects of the nutritional supplementation with bioactive compounds omega-3 and soluble fibre and soy in parameters of insulin resistance, as well as their potential effect on energy metabolism and metabolic memory, indicated by changes in mitochondria.

An animal mouse models to which were induced insulin resistance by a hypercaloric diet was used. Afterwards, the animals were treated with the described bioactive compounds together with normocaloric and hypercaloric diets.

The results showed that the adequation of energy intake decreases the values of the parameters related to the metabolic syndrome. The supplementation with the bioactive compounds in a context of normocaloric diet did not provide any added value for the treatment of insulin resistance. However, in a context of a hypercaloric diet, the addition of bioactive compounds revealed similar levels of insulin sensitivity like the treatment with a normocaloric diet. Moreover, the addition of bioactive compounds in a normocaloric or hypercaloric diet revert the changes in mitochondrial protein levels in comparison with a hypercaloric. Although the changes observed in relation to insulin sensitivity and the mitochondria, the intake of soy and soluble fibre increased the protein oxidative damage, suggesting possible long-term effects of the supplementation of these compounds in insulin resistance situations.

It can be finally concluded that the observed effects in the mitochondria and possibly on the metabolism as a result of a hypercaloric diet in situations of insulin resistance can be reversed. Suggesting that the mitochondria has the capacity of adaptation in relation to energy availability.

ÍNDEXS

ÍNDEXS	23
ÍNDIX DE TAULES	29
ÍNDIX DE FIGURES	31
ABREVIACIONS	35
I. INTRODUCCIÓ	39
1. INTRODUCCIÓ I DEFINICIÓ	41
2. PREVALENÇA	42
3. FISIOPATOLOGIA DE LA SÍNDROME METABÒLICA	43
3.1 Resistència a la insulina	45
3.2 Resistència a la insulina i funció mitocondrial	46
II. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS	51
1. JUSTIFICACIÓ	53
2. HIPÒTESIS	54
III. OBJECTIUS	55
1. OBJECTIU GENERAL	57
2. OBJECTIUS ESPECÍFICS	57
IV. MATERIALS I MÈTODES	59
1. DISSENY EXPERIMENTAL	61
1.1. Intervenció dietètica	62
1.2. Preparació de les dietes	62
1.3. Animals	64
2. MATERIALS I MÈTODES	64
2.1. Procediments	64
2.1.1. Corba de glucosa	65
2.1.2. Corba d'insulina	65
2.1.3. Sacrifici i obtenció de mostres	65
2.2. Anàlisis de mostres	65
2.2.1. Paràmetres de bioquímica sanguínia relacionats amb el metabolisme	65
2.2.2. Determinació de la capacitat antioxidant en plasma. FRAP	65
2.2.3. Contingut carbohidrats en femta i en el contingut cecal	66
2.2.4. Western-blot	66
2.2.4.1. Homogeneïtzació dels teixits	66
2.2.4.2. Quantificació de proteïnes	67
2.2.4.3. Electroforesi i transferència	67
2.2.5. Quantificació del dany oxidatiu proteic	68
2.2.5.1. Preparació de la mostra	68
2.2.5.2. Sistema cromatogràfic	69
2.2.5.3. Condições cromatogràfiques	69
2.2.5.4. Quantificació dels analits	70
2.2.6. Quantificació de l'ADNmt	70

2.2.6.1. Extracció de l'ADN	70
2.2.6.2. Quantificació de la concentració de l'ADN per Nanodrop®	71
2.2.6.3. Quantificació dels nivells d'ADNmt	71
2.3. Anàlisis estadístic	71
V. RESULTATS.....	73
V.1. EFECTE DE L'ADEQUACIÓ ENERGÈTICA.....	75
A. MODEL D'INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA. DIETA HIPERCALÒRICA I HIPERGRASSA.....	77
B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB DIETA NORMOCALÒRICA.....	80
1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC.....	80
2. SENSIBILITAT A LA INSULINA.....	81
3. CANVIS EN L'ADNmt I PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI	86
3.1. ADNmt	86
3.2. Porina	88
3.3. Canvis en els complexos mitocondrials.....	89
3.3.1. Complexos mitocondrials al múscul.....	89
3.3.2. Complexos mitocondrials al teixit adipós	91
3.3.3. Complexos mitocondrials al fetge	92
3.4. SIRT1.....	95
3.5. PGC-1 α	96
2.6. MFN2	97
3.7. BCL2.....	99
4. DANY OXIDATIU	100
4.1. Dany oxidatiu proteic directe	101
4.2. Dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació	101
4.3. Dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació	102
4.4. Dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació	102
4.5. Dany oxidatiu proteic derivat de la reacció del fumarat amb la cisteïna	103
4.6. Enzim antioxidant SOD1	105
5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA.....	106
C. DISCUSSIÓ	106
V.2. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB OMEGA-3	111
A. INTRODUCCIÓ.....	113
1. OMEGA-3 I RESISTÈNCIA A LA INSULINA.....	114
2. OMEGA-3 I BIOGÈNESI MITOCONDRIAL.....	115
3. OMEGA-3 I ESTRÉS OXIDATIU.....	116
B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB OMEGA-3 EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC.....	117
1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC.....	118
2. SENSIBILITAT A LA INSULINA.....	121
3. CANVIS EN L'ADNmt I LES PROTEÏNES MITOCONDRIALS	124
3.1. ADNmt	124
3.2. Porina	125
3.3. Canvis en els complexos mitocondrials.....	126
3.3.1. Complexos mitocondrials al múscul.....	126
3.3.2. Complexos mitocondrials al teixit adipós	127
3.3.3. Complexos mitocondrials al fetge	127
3.4. SIRT1.....	128
3.5. PGC-1 α	129
3.6. MFN2	129

3.7. BCL2	130
4. DANY OXIDATIU	131
4.1. Dany oxidatiu proteic directe	131
4.2. Dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació	131
4.3. Dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació	132
4.4. Dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació	132
4.5. Dany oxidatiu proteic derivat de la reacció del fumarat amb la cisteïna	133
4.6. Enzim antioxidant SOD1	133
5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA	134
C. DISCUSSIÓ	135
V.3. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB FIBRA SOLUBLE	139
A. INTRODUCCIÓ	141
1. FIBRA I RESISTÈNCIA A LA INSULINA	142
2. FIBRA I FERMENTACIÓ COLÒNICA	143
B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB FIBRA SOLUBLE EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC.....	144
1. INGESTA, PES I PARÀMETRES BIOQUÍMICS	145
2. SENSIBILITAT A LA INSULINA.....	148
3. CANVIS EN L'ADNmt i PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI	151
3.1. ADNmt	151
3.2. Porina	152
3.3. Canvis en els complexos mitocondrials.....	152
3.3.1. Complexos mitocondrials al múscul.....	153
3.3.2. Complexos mitocondrials al teixit adipós	153
3.3.3. Complexos mitocondrials al fetge	154
3.4. SIRT1	155
3.5. PGC-1 α	156
3.6. MFN2	156
3.7. BCL2.....	157
4. DANY OXIDATIU	158
4.1. Dany oxidatiu proteic directe	158
4.2. Dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació	158
4.3. Dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació	159
4.4. Dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació	159
4.5. Dany oxidatiu proteic derivat de la reacció del fumarat amb la cisteïna	160
4.6. Enzim antioxidant SOD1	160
5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA	161
C. DISCUSSIÓ	161
V.4. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB SOJA	165
A. INTRODUCCIÓ.....	167
B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB SOJA EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC.....	169
1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC	170
2. SENSIBILITAT A LA INSULINA.....	172
3. CANVIS EN L'ADNmt i PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI	176
3.1. ADNmt	176
3.2. Porina	176
3.3. Canvis en els complexos mitocondrials.....	177
3.3.1. Complexos mitocondrials al múscul.....	177
3.3.2. Complexos mitocondrials al teixit adipós	178
3.3.3. Complexos mitocondrials al fetge	179

3.4. SIRT1	180
3.5. PGC-1 α	181
3.6. MFN2	181
3.7. BCL2	182
4. DANY OXIDATIU	183
4.1. Dany oxidatiu proteic directe	183
4.2. Dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació	183
4.3. Dany oxidatiu proteic derivat de lipoxidació	184
4.4. Dany oxidatiu proteic derivat de glico i lipoxidació	184
4.5. Dany oxidatiu proteic derivat de la reacció del fumarat amb la cisteïna	185
4.6. Enzim antioxidant SOD1	186
5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA	186
C. DISCUSSIÓ	187
VI. DISCUSSIÓ	191
VII. CONCLUSIONS	201
1. CONCLUSIÓ GENERAL.....	203
2. CONCLUSIONS ESPECÍFIQUES	203
VIII. BIBLIOGRAFIA	205

ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Criteris clínics per al diagnòstic de la síndrome metabòlica.....	41
Taula 2. Composició de les dietes dels grups experimentals en la intervenció nutricional.....	63
Taula 3. Composició en macronutrients de les dietes ingerides pels grups experimentals en la intervenció nutricional.....	64
Taula 4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per la immunodetecció per western-blot....	67
Taula 5. Relació dels ions de m/z d'analits mesurats mitjançant GC/MS.	70
Taula 6. Guany de pes corporal, consum alimentari i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	81
Taula 7. Composició en àcids grassos de les dietes normocalòrica i hipercalòrica amb l'addició d'oli de peix.....	117
Taula 8. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	119
Taula 9. Quantitat de fibra insoluble i soluble en les dietes.	145
Taula 10. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	146
Taula 11. Composició nutricional de la beguda de soja	169
Taula 12. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb soja.	171

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Vista general dels paràmetres de la síndrome metabòlica.	42
Figura 2. Fisiopatologia de la síndrome metabòlica i de la resistència a la insulina.....	44
Figura 3. Resistència a la insulina i perfil lipoproteic aterogènic.....	45
Figura 4. Esquema del procediment i dels grups experimentals duts a terme.	61
Figura 5. Pes i Ingesta dietètica i calòrica després de la inducció de la RI.	78
Figura 6. Tolerància a la glucosa després de la inducció de la RI.....	79
Figura 7. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	82
Figura 8. Control glucèmic després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. ...	83
Figura 9. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	84
Figura 10. Conseqüència metabòlica de l'excés de greix a la dieta.	85
Figura 11. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	87
Figura 12. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	88
Figura 13. Complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	90
Figura 14. Complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	92
Figura 15. Complexos mitocondrials en el fetge després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	93
Figura 16. Mecanismes pels quals AMPK i SIRT1 s'activen i milloren l'activació de PGC-1 α que al seu torn estimula la biogènesi i la funció mitocondrial.	94
Figura 17. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	95
Figura 18. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	96
Figura 19. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	97
Figura 20. Canvis produïts amb una dieta hipercalòrica (HC) i els efectes d'una dieta normocalòrica (NC).	99
Figura 21. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	100
Figura 22. Nivells de SAG després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. ...	101

Figura 23. Nivells de CEL després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. ..	102
Figura 24. Nivells de MDAL després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	102
Figura 25. Nivells de CML després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. ...	103
Figura 26. Nivells de 2SC després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. ..	104
Figura 27. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	105
Figura 28. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.	106
Figura 29. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb omega-3.....	118
Figura 30. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb omega-3.	120
Figura 31. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb omega-3.	121
Figura 32. Concentració de fructosamina després de dos mesos de tractament amb omega-3	122
Figura 33. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb omega-3	123
Figura 34. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb omega-3.	123
Figura 35. Avaluació del ADNmt després de dos mesos de tractament amb omega-3.	124
Figura 36. Quantificació dels complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb omega-3.	126
Figura 37. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb omega-3....	125
Figura 38. Quantificació dels complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb omega-3.	127
Figura 39. Quantificació dels complexos mitocondrials en el fetge després de dos mesos de tractament amb omega-3.	128
Figura 40. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb omega-3.	129
Figura 41. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb omega-3. ...	129
Figura 42. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	130
Figura 43. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	130
Figura 44. Nivells de SAG després de dos mesos de tractament amb omega-3.	131
Figura 45. Nivells de CEL després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	132
Figura 46. Nivells de MDAL després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	132
Figura 47. Nivells de CML després de dos mesos de tractament amb omega-3.	133
Figura 48. Nivells de 2SC després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	133

Figura 49. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb omega-3.....	134
Figura 50. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb omega-3	134
Figura 51. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb fibra soluble.	145
Figura 52. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	147
Figura 53. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb fibra soluble..	148
Figura 54. Fructosamina en plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble	149
Figura 55. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	149
Figura 56. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. .	150
Figura 57. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. ...	151
Figura 58. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	152
Figura 59. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	153
Figura 60. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	154
Figura 61. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	155
Figura 62. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. .	156
Figura 63. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	156
Figura 64. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. .	157
Figura 65. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. ..	157
Figura 66. Nivells de SAG després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	158
Figura 67. Nivells de CEL després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.....	158
Figura 68. Nivells de MDAL després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.....	159
Figura 69. Nivells de CML després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	159
Figura 70. Nivells de 2SC després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.....	160
Figura 71. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. .	160
Figura 72. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.	161
Figura 73. Mecanismes fisiològics pels quals la fibra dietètica afecta la regulació del pes corporal.....	162

Figura 74. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb soja.	170
Figura 75. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb soja.	172
Figura 76. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb soja.	173
Figura 77. Fructosamina en plasma després de dos mesos de tractament amb soja.	174
Figura 78. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb soja.	174
Figura 79. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb soja.	175
Figura 80. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb soja.	176
Figura 81. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb soja.	177
Figura 82. Complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb soja.	178
Figura 83. Complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb soja.	178
Figura 84. Complexos mitocondrials al fetge després de dos mesos de tractament amb soja.	179
Figura 85. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb soja.	180
Figura 86. Quantificació de de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb soja.	181
Figura 87. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb soja.	182
Figura 88. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb soja.	183
Figura 89. Nivells de semialdehid glutàmic després de dos mesos de tractament amb soja.	183
Figura 90. Nivells de N ϵ -(Carboxietil)lisina després de dos mesos de tractament amb soja.	184
Figura 91. Nivells de malondialdehid-lisina després de dos mesos de tractament amb soja.	184
Figura 92. Nivells de N ϵ -(carboximetil)lisina després de dos mesos de tractament amb soja.	185
Figura 93. Nivells de 2-succinyl-cysteine després de dos mesos de tractament amb soja.	185
Figura 94. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb soja.	186
Figura 95. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb soja.	187
Figura 96. Pes i àrea sota la corba (AUC) després dels 2 mesos de tractament.	195
Figura 97. Avaluació de l'ADNmt després dels dos mesos de tractament.	197
Figura 98. Nivells de CML després dels dos mesos de tractament.	197
Figura 99. Òrgans i teixits involucrats en l'homeòstasis de la glucosa.	198

ABREVIACIONES

2SC	S-(2-Succinyl)-Cysteine
ADNmt	ADN mitocondrial
AGL	Àcids grassos lliures
AHAV	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric
AMPKα	5' AMP-activated protein kinase
ATP	Adenosine Triphosphate
AUC	Àrea sota la corba
BCL2	B-cell lymphoma 2
BSA	Albúmina sèrica bovina
CEL	N ^ε -carboxietil-D,L-lisina
CML	N ^ε -carboximetil-D,L-lisina
Col. Total	Colesterol Total
DHA	Àcid docosahexaenoic
DM2	Diabetis mellitus tipus 2
EPA	Àcid eicosapentaenoic
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
GC/MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrofotometria de masses
GLUT 2	Transportador de Glucosa Tipus 2
GLUT 4	Transportador de Glucosa Tipus 4
GSA	Semialdehid glutàmic
HC	Dieta Hipercalòrica
HC+F	Dieta Hipercalòrica + Fibra soluble
HC+OP	Dieta Hipercalòrica + Oli de peix
HC+S	Dieta Hipercalòrica + Soja
HDL	Lipoproteïna d'alta densitat
LDL	Lipoproteïna de baixa densitat
MCV	Malaltia cardiovascular

MDAL	Malondialdehid-lisina
MFN2	Mitofusin-2
NC	Dieta Normocalòrica
NC+F	Dieta Normocalòrica + Fibra soluble
NC+OP	Dieta Normocalòrica + Oli de peix
NC+S	Dieta Normocalòrica + Soja
PGC-1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
RI	Resistència a la Insulina
ROS	Espècies reactives d'oxigen
SCGT	Test de tolerància subcutània a la glucosa
SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
SM	Síndrome metabòlica
SOD1	Superoxide dismutase
TG	Triglicèrids
VLDL	Lipoproteïna de molt baixa densitat

I. INTRODUCCIÓ

1. INTRODUCCIÓ I DEFINICIÓ

El concepte de síndrome metabòlica (SM) existeix des de fa almenys 90 anys i va ser descrit per primera vegada per Kylin com l'agrupació de la hipertensió, la hiperglucèmia i la gota (Kylin E, 1923 citat per Eckel et al ¹). Més tard, Vague va donar importància a l'adipositat superior del cos associada amb la diabetis mellitus tipus 2 (DM2) i la malaltia cardiovascular (MCV) (Vague J, 1947 citat per Eckel et al ¹). Però no va ser fins el 1988 que Reaven va descriure el concepte modern de SM on va postular que la resistència a la insulina (RI) era la causa de la intolerància a la glucosa, la hiperinsulinèmia, l'augment de la lipoproteïna de molt baixa densitat (VLDL), la disminució de la lipoproteïna d'alta densitat (HDL) i la hipertensió ². No obstant això, la SM no és una malaltia específica i actualment hi ha un debat en curs sobre la seva definició. En la Taula 1 es llisten els factors més acceptats que són necessaris per fer el diagnòstic de SM.

Taula 1. Criteris clínics per al diagnòstic de la síndrome metabòlica.

Mesura Clínica	WHO ^a	ATPIII ^b	IDF ^c
Resistència a la insulina	Intolerància a la glucosa, glucosa alterada en dejú, resistència a la insulina. Aquest criteri més 2 dels següents criteris	No inclòs com a criteri, sent necessaris 3 dels 5 criteris següents	No inclòs com a criteri, sent necessaris 3 dels 5 criteris següents
Dislipidèmia	TG>1,695 mmol/L HDL <0,9 mmol/L (homes) <1,0 mmol/L (dones)	TG>1,695 mmol/L HDL <0,9 mmol/L (homes) <1,0 mmol/L (dones)	TG>1,7 mmol/L HDL<1,03 mmol/L
Pressió arterial	>140/90 mmHg	>130/85 mmHg	>130/85 mmHg
Glucosa en plasma	>7,0 mmol/L (dejú)	>5,5 mmol/L	>5,5 mmol/L
Obesitat Central	Relació cintura/maluc >0,90 (homes) >0,85 (dones)	Circumferència de la cintura >102 cm (homes) >88 cm (dones)	Circumferència de la cintura >94 cm
Altres	Relació de l'excreció urinària d'albúmina >20 mg/min o quocient albúmina/creatinina >30 mg/g		

Es detallen els criteris establerts per cada institució ^aWorld Health Organization ³, ^bNational Cholesterol Education Programme (Adult Treatment Panel III) ⁴, ^cInternational Diabetes Federation ⁵.

Tot i aquesta discrepància en la seva definició, podríem referir a la SM com una combinació de factors de risc per la MCV i la DM2 (Figura 1), que inclouen obesitat central, hipertensió, dislipidèmia, una alteració del metabolisme glucídica i RI ^{1,6-8}.

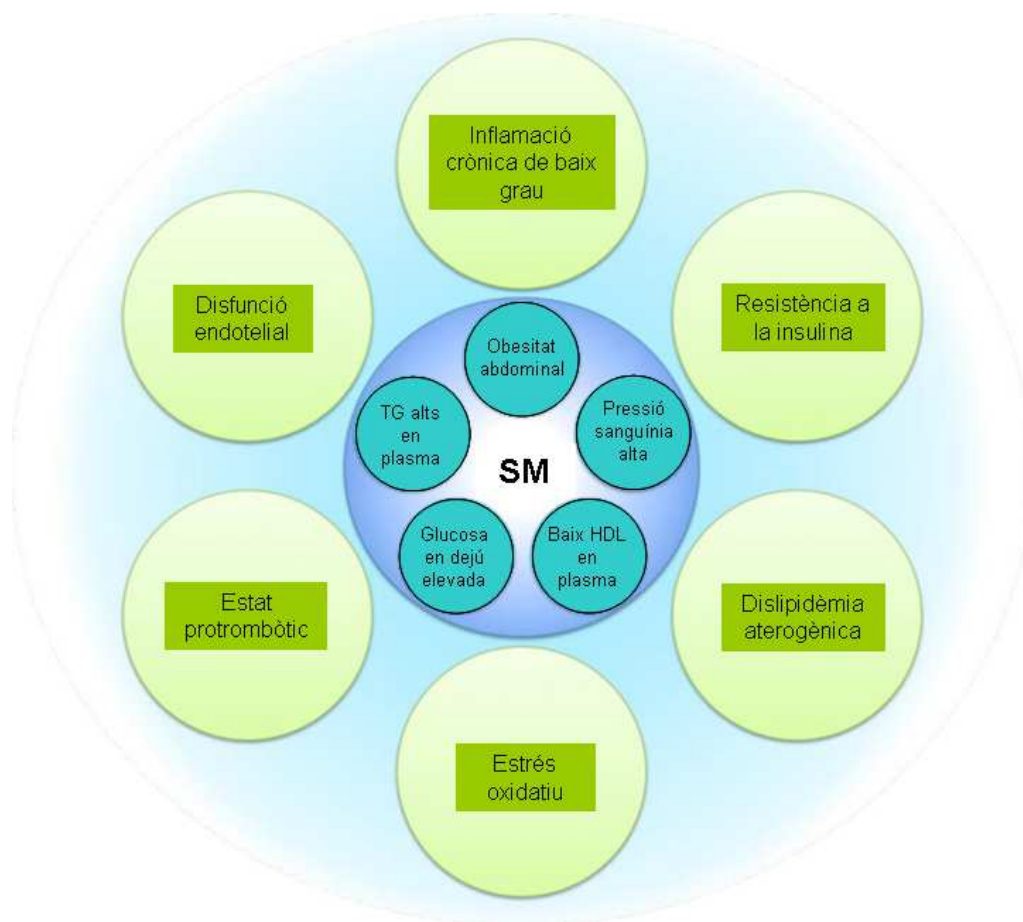


Figura 1. Vista general dels paràmetres de la síndrome metabòlica.

Independentment de la definició de la síndrome metabòlica (SM) que s'utilitzi, les persones classificades amb SM, presenten una combinació de paràmetres clau, com l'obesitat abdominal, glucosa en dejú elevada, disminució del colesterol HDL, triglicèrids (TG) alts en plasma en dejú, i pressió arterial elevada (cercles interns). A més d'aquestes característiques definidores, la SM s'associa, a més, amb la inflamació crònica de baix grau, resistència a la insulina, dislipidèmies aterogèniques i lipoproteïnes disfuncionals, estrés oxidatiu elevat, un estat protrombòtic i la disfunció endotelial (cercles externs). Tots aquests factors contribueixen a l'augment del risc de malaltia cardiovascular i diabetis mellitus tipus 2 en la població. Figura adaptada de Andersen & Fernandez⁹

2. PREVALENÇA

Les dades existents indiquen que la incidència de la SM està augmentant a un ritme alarmant^{10,11}. Aquest increment està associat amb l'epidèmia mundial de l'obesitat i diabetis¹² i als canvis en hàbits nutricionals, que la converteix en un important problema de salut pública¹³ requerint noves estratègies preventives i terapèutiques.

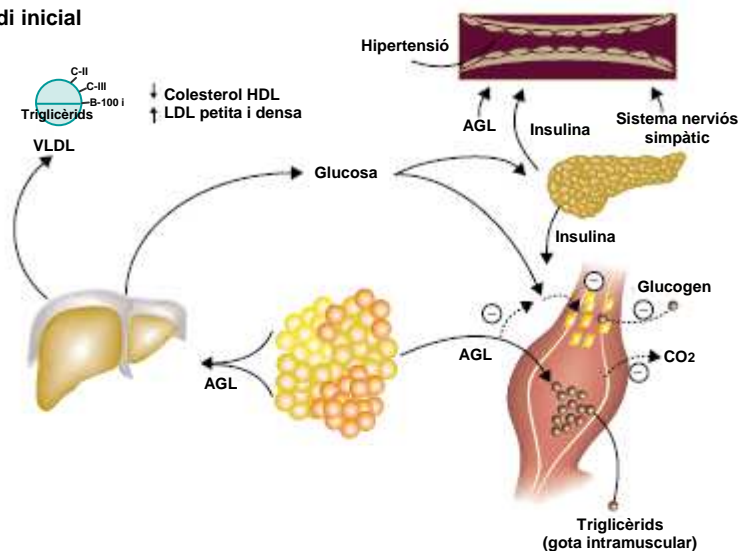
Les dades més recents que comparen la National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) III i la NHANES 1999-2006 indiquen que hi ha un increment persistent de la prevalença de la SM entre els adults dels Estats Units, mostrant que la prevalença de la SM va augmentar entre els adults nord-americans d'un 28% a un 34% ¹⁴. També assenyalen l'augment de la prevalença de l'obesitat entre la NHANES III 1988-1994 i la NHANES 1999-2000 que va ser de 22,9 i 30,5% respectivament, i que aquest increment de l'obesitat va representar la major part de l'augment corresponent a la SM ¹¹. En general, la International Diabetes Federation (IDF 2006) estima que una quarta part de la població adulta al món té la SM ⁵.

Una de les primeres dades de SM a Espanya va ser aportada per la Enquesta Nutricional de Canarias realitzada en adults de 18 i 74 anys, on es va observar que la prevalença de SM va ser del 24,4%, sense trobar diferències entre sexes ¹⁵. Un estudi comparatiu entre una cohort espanyola respecte a la de San Antonio Heart Study ¹⁶ va demostrar per una banda, que la prevalença de SM als homes és superior a la cohort americana (el 28,9 front al 20,8%) i per altra banda que les dones espanyoles mostraven una major prevalença de SM respecte a les americanes (el 30,9 front al 27,1%). A més, els autors indiquen que l'obesitat i, especialment, el perímetre abdominal expliquen aquestes diferències i adverteixen que l'augment de l'obesitat en els dos països conduirà al increment de la prevalença de SM. Aquestes dades coincideixen amb l'informe de la SEEDO, en el que l'obesitat és més prevalent en les dones (el 15,7 front al 13,4%) ¹⁷.

3. FISIOPATOLOGIA DE LA SÍNDROME METABÒLICA

Tal i com es representa en la Figura 2, en la fisiopatologia de la SM s'apleguen alteracions en el metabolisme glucolipídic, estats proinflamatoris i protrombòtics. El vincle entre totes elles s'atribueix a la RI, afavorida per l'augment d'àcids grassos lliures (AGL) a la sang, moltes vegades relacionat amb el sobrepès. Aquest estat provoca trastorns en la utilització de la glucosa cel·lular, així com la desregulació de la seva producció hepàtica. Encara que la RI és coneguda per ser el principal factor del desenvolupament de la SM, es suggereix que l'obesitat és el vincle comú entre els principals factors de SM ¹⁸.

A. Estadi inicial



B. Estadi avançat

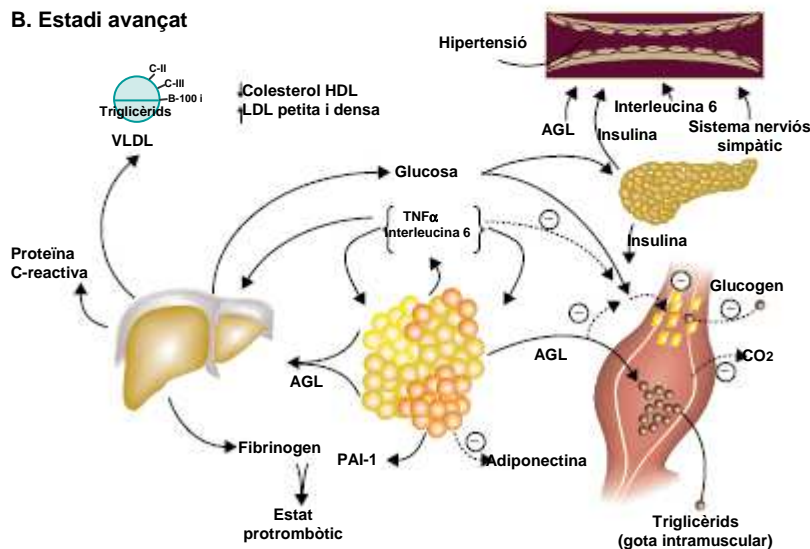


Figura 2. Fisiopatologia de la síndrome metabòlica i de la resistència a la insulina.

A. Estadi inicial: Els àcids grassos lliures (AGL) s'alliberen abundantment del teixit adipós expandit. En el fetge, els AGL produeixen un augment de la producció de glucosa, triglicèrids (TG) i la secreció de lipoproteïnes de molt baixa densitat (VLDL). Les anomalies associades amb els lípids i les lipoproteïnes inclouen reduccions en les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) i un augment de la densitat de les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL). Els AGL també redueixen la sensibilitat a la insulina en el múscul, inhibint l'absorció de glucosa dependent de la insulina. Els defectes associats inclouen una reducció de la partició de glucosa en glucògen i l'augment de l'acumulació de lípids en TG. Els augments en la glucosa circulant i en certa mesura dels AGL augmenten la secreció pancreàtica d'insulina que resulta en hiperinsulinèmia. La hiperinsulinèmia pot resultar en una major reabsorció de sodi i l'augment de l'activitat del sistema nerviós simpàtic i contribueix a la hipertensió, incrementant els nivells circulants d'AGL. B. Estadi avançat: Els efectes paracrí i endocrí de l'estat proinflamatori contribueixen a la resistència a la insulina produïda per l'excés d'AGL. Produït per una varietat de cèl·lules en el teixit adipós que inclouen adipòcits i macròfags derivats de monòcits, l'augment de la secreció d'interleucina-6 (IL-6) i el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) entre altres, resulta en un major grau de resistència a la insulina i de la lipòlisis de TG. IL-6 i altres citocines també estan augmentades a la circulació i poden millorar la producció de glucosa hepàtica i la producció de VLDL pel fetge relacionat amb la sensibilitat a la insulina al múscul. Les citocines i AGL també augmenten la producció de fibrinogen i del inhibidor del activador del plasminògen-1 (PAI-1) pel fetge que complementa la sobreproducció de PAI-1 pel teixit adipós. Això resulta en un estat pro-trombòtic. Les reduccions en la producció de la citocina adiponectina que és antiinflamatori i sensibilitzant a la insulina també s'associa amb la síndrome metabòlica i la resistència a la insulina. Reproduït d'Eckel et al ¹.

El metabolisme lipídic presenta també les conseqüències de la RI, que desemboquen a la dislipidèmia i es caracteritza per l'elevació de triglicèrids (TG) i

VLDL i un descens d'HDL, el que s'ha denominat fenotip lipoproteínic aterogènic ¹⁹ (Figura 3).

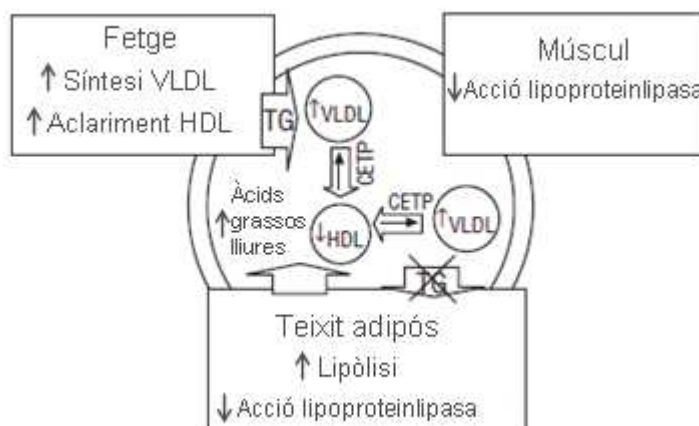


Figura 3. Resistència a la insulina i perfil lipoproteínic aterogènic.

L'augment de l'alliberació d'àcids grassos lliures i la síntesi de triglicèrids (TG) són els punts clau en les alteracions lipídiques de la síndrome metabòlica. La dislipidèmia a la síndrome metabòlica es caracteritza per l'elevació de TG i VLDL i un descens de HDL. Figura adaptada de Gimeno et al ²³

L'evidència ha demostrat que la RI és un factor de risc per al desenvolupament de la DM2, SM i MCV en els éssers humans ²⁰⁻²², sent d'especial importància la recerca de mesures per al tractament i prevenció d'aquesta síndrome.

3.1 RESISTÈNCIA A LA INSULINA

La RI sembla ser el mediador principal de la SM ²⁴ i es refereix a una inadequada captació de glucosa depenent d'insulina per part dels teixits, en especial el fetge, múscul i teixit adipós. És a dir, hi ha una disminució de la capacitat de resposta del múscul (captació de glucosa), del fetge (inhibició de la gluconeogènesi) i de les cèl·lules grasses (inhibició de la lipòlisi) ²⁵.

La insulina és una hormona alliberada per les cèl·lules β -pancreàtiques en resposta a l'augment dels nivells de glucosa en sang, sent la funció principal la de facilitar la captació de glucosa en el múscul, teixit adipós i fetge i la captació de greixos en el teixit adipós. A més, pot influir en la lipòlisi i la producció de glucosa pels hepatòcits. Una de les accions més sensibles de la insulina és la inhibició de la lipòlisi en el teixit adipós ²⁶. En els estats de RI contribueix a la hiperlipidèmia per la falta de sensibilitat a la insulina ²⁷. Per tant, quan es desenvolupa la RI, l'augment de la quantitat de la lipòlisi de TG emmagatzemats en el teixit adipós produeix més àcids grassos, que podrien inhibir encara més l'efecte antilipolític de la insulina (Figura 2).

Per un altre costat, els AGL suposen un excés de substrat energètic per als teixits sensibles a la insulina i provoquen alteracions del sistema de senyals que regulen el metabolisme de la glucosa. Al múscul modifiquen l'acció de les proteïnaquineses i al fetge augmenten la producció de glucosa i disminueixen la inhibició de la producció de glucosa depenent de la insulina (Figura 2).

L'acumulació excessiva de greix s'associa amb l'estrès oxidatiu sistèmic en els éssers humans ²⁸. Estudis en animals indiquen que l'augment de l'estrès oxidatiu derivat de l'acumulació de greix és un factor de risc primerenc de la SM ²⁹. Específicament, la sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) en el teixit adipós i el fetge dels ratolins precedeix l'aparició de l'obesitat i la RI induïda per una dieta alta en greix ³⁰.

3.2 RESISTÈNCIA A LA INSULINA I FUNCIO MITOCONDRIAL

L'alarmant i creixent prevalença de la SM en tot el món i que a més, aspectes de la biologia que sustenta aquest fet, són poc coneguts, fa necessari la comprensió de la patogènesis per poder desenvolupar teràpies futures. Una de les qüestions més polèmiques d'avui en dia és si la funció mitocondrial alterada està involucrada en el desenvolupament de la RI ^{31,32}, a més, hi ha estudis que han observat una forta correlació entre la disfunció mitocondrial induïda per l'estrès oxidatiu i la SM ³³. Respecte a nombroses observacions, s'ha fet una associació entre el mitocondri i la RI, que en general s'ha centrat en la reducció del contingut mitocondrial i de la capacitat i/o la funció mitocondrial en pacients o animals resistents a la insulina ³⁴.

Els mitocondris són orgànuls citoplasmàtics de doble membrana i que es troben a la majoria de cèl·lules eucariotes. L'investigador alemany Richard Altmann va observar els mitocondris al segle XIX, i es pensava que es tractaven d'organismes independents. Al 1967 Lynn Margulis va popularitzar la teoria de l'endosimbiosi ³⁵ i que avui en dia és àmpliament acceptada. Aquesta teoria suggereix que els mitocondris van ser originalment cèl·lules procariotes, capaces d'implementar mecanismes oxidatius que s'haurien instal·lat a l'interior d'una cèl·lula eucariota primitiva de forma simbiòtica, és a dir, la procariota fagocitada proporcionava energia en forma d'ATP i la cèl·lula hoste oferia un medi estable i ric en nutrients.

En aquest sentit, els mitocondris són el principal lloc de producció d'ATP cel·lular, el que representa fins a un 90% de tot l'ATP produït en funció del tipus de teixit ³⁶. A més de proporcionar energia a les cèl·lules, els mitocondris estan involucrats en altres processos, com la senyalització cel·lular, la diferenciació cel·lular, la mort cel·lular programada, així com el control del cicle i creixement cel·lular ^{37,38}. Per tant, el bon funcionament dels mitocondris està relacionat amb un bon estat de salut, i recíprocament, la disfunció mitocondrial pot contribuir a una varietat de condicions cròniques, com l'obesitat ³⁹, la RI ⁴⁰, les malalties coronàries ⁴¹ i l'envelliment ⁴².

Els mecanismes responsables de la disfunció mitocondrial són desconeguts actualment. Per un costat, es discuteix si la disfunció mitocondrial per diversos factors, com l'estrès oxidatiu entre altres, és un factor de predisposició a l'obesitat i RI; o per l'altre costat, si l'excés d'energia disponible a nivell cel·lular induïx una sobrecàrrega mitocondrial promovent la seva disfunció i posteriorment l'aparició de RI i obesitat. S'ha estudiat que la disfunció mitocondrial s'expressa per una ineficiència del consum d'O₂ mitocondrial, un increment en la producció de ROS, alteracions en el potencial de membrana mitocondrial i una caiguda en els nivells d'ATP a causa d'un desequilibri entre ingesta i despesa energètica ⁴³.

A la literatura podem trobar molts articles relacionats amb la disfunció mitocondrial, ja als anys 90 es va constatar que el múscul esquelètic de pacients amb DM2 es caracteritzava per l'alteració de la capacitat oxidativa de la glucosa ⁴⁴ i dels lípids ⁴⁵ i estava relacionat amb la capacitat oxidativa mitocondrial ⁴⁶. A més, també s'ha observat una disfunció mitocondrial en múscul ⁴⁷ i una reducció dels mitocondris del múscul esquelètic de pacients amb DM2 ⁴⁸. En aquest sentit, s'ha observat un deteriorament funcional en la respiració mitocondrial en múscul de pacients amb DM2, que pot contribuir al desenvolupament de la DM2 en els pacients amb obesitat ⁴⁹.

Per un altre costat, en relació a la disfunció mitocondrial com a conseqüència de la RI, Bonnard et al van induir RI a ratolins amb una dieta hipergrassa durant 4 setmanes i no van observar evidència de disfunció mitocondrial, van continuar 4 setmanes més i van observar una alteració en la biogènesi mitocondrial, l'estructura i la funció en el teixit muscular ³³. Van concloure que les alteracions mitocondrials no precedeixen a l'aparició de la RI i que resulten de l'augment de la producció de ROS al múscul ³³. Per tant, aquest estudi indica que les alteracions detectables en la morfologia mitocondrial es produeixen després de l'aparició de la RI.

Respecte el nombre i mida mitocondrial, s'ha observat una reducció en el nombre dels mitocondris, del contingut d'ADN mitocondrial (ADNmt), i dels enzims respiratoris, així com un trastorn de la xarxa mitocondrial, que són consistents amb la disminució de la fosforilació oxidativa i la β -oxidació en el teixit adipós de ratolins amb DM2 ⁵⁰, indicant aquestes dades que la pèrdua mitocondrial en el teixit adipós es correlaciona amb el desenvolupament de DM2. No obstant això, encara que la disminució de la mida mitocondrial és una característica en pacients joves amb RI i obesitat, també ho és en descendents de pacients amb RI ⁵¹, el que suggereix certa predisposició genètica al desenvolupament de disfunció mitocondrial que aquesta pot influir a una acumulació de lípids en les cèl·lules que condueix a defectes en la senyalització d'insulina i posteriorment RI. En aquest sentit, s'ha observat que la RI en el múscul esquelètic de descendents insulinoresistents de pacients amb DM2 és associada amb una desregulació del metabolisme dels àcids grassos intramiocel·lulars, possiblement a causa d'un defecte hereditari en la fosforilació oxidativa mitocondrial ⁴⁰.

Hi ha la hipòtesis de que l'excés de disponibilitat energètica a nivell cel·lular, possiblement per efectes "d'intoxicació energètica", tendeix a reduir la funcionalitat mitocondrial. La insulina, a més de regular l'expressió d'enzims claus en el metabolisme, també està implicada en la modulació de la biogènesi mitocondrial ⁵². Per exemple, s'ha observat disminucions en les expressions de PGC-1 α , PGC-1 β , NRF1 i NRF2 a nivell muscular en pacients amb RI i obesitat ^{53,54}, suggerint que l'increment de la insulina plasmàtica pot ser responsable de la disminució en la biogènesi mitocondrial i per tant en la funcionalitat mitocondrial. De la mateixa manera, les dietes elevades en greix tendeixen a disminuir l'expressió de PGC-1 α , PGC-1 β i de les proteïnes de la cadena de transport d'electrons al múscul esquelètic ⁵⁵.

Malgrat totes aquestes evidències que relacionen una deficiència o disminució del contingut mitocondrial al múscul en situacions de RI, per un costat, recentment s'ha publicat una revisió en la que conclou que la reducció del 30% del contingut mitocondrial en pacients amb DM2 no és responsable de la RI ³². Per contra, hi ha estudis que indiquen que hi ha un augment dels mitocondris musculars en ratolins amb RI ⁵⁶⁻⁵⁸, encara que aquest increment dels mitocondris pot ser un procés inicial transitori ⁵⁹.

Tot i l'ampli nombre d'estudis que correlacionen la funció mitocondrial alterada al múscul esquelètic amb la DM2, no està clar si els resultats observats en el múscul

esquelètic es poden aplicar a altres teixits sensibles a la insulina que tenen marcadament diferents funcions metabòliques. Així, es sap poc sobre la importància fisiològica dels mitocondris en el teixit adipós i el fetge. Per exemple, malgrat el paper central del fetge en l'homeòstasi de la glucosa i l'acció de la insulina, hi ha pocs estudis que han examinat el paper de la disfunció mitocondrial hepàtica en la RI i la DM2. En un estudi realitzat en rosegadors, es va observar que els animals diabètics havien reduït la capacitat oxidativa en mitocondris aïllats de fetge ⁶⁰. En un altre estudi en rates amb RI tenien una reducció de la capacitat respiratòria i un augment de l'estrès oxidatiu en mitocondris de fetge ⁶¹.

El paper del teixit adipós en el desenvolupament de la RI és complex. Hi ha evidència que suggereix que la disfunció del teixit adipós visceral està més estretament associada amb la RI que la disfunció del teixit adipós subcutani ⁶². S'ha observat una reducció del contingut mitocondrial en el teixit adipós blanc visceral que es produeix després de la hiperglucèmia, encara que suggereixen que aquesta reducció no sembla ser la causa primària a la RI, però que pot tenir un paper clau en l'empitjorament de la malaltia ⁶³. En un altre estudi també van observar una reducció del contingut mitocondrial en el teixit adipós, i que aquesta reducció ocorria després del desenvolupament de l'alteració de l'homeòstasi de la glucosa ⁶⁴. L'escassetat de dades en aquest àmbit posa en relleu la necessitat de realitzar més estudis sobre el paper de la disfunció mitocondrial al fetge i al teixit adipós en l'etiologia de la RI.

Un altre aspecte a tenir en compte en la hiperglucèmia, és que tot i el control glucèmic, hi ha complicacions que es continuen manifestant. Aquest fenomen s'anomena memòria metabòlica i es recolza en estudis realitzats en models animals i cultius cel·lulars, així com en pacients amb diabetis ⁶⁵. Per exemple, la progressió de la retinopatia diabètica s'associa amb el dany de l'ADNmt, i això s'ha relacionat amb la memòria metabòlica ⁶⁶. A més, també s'ha relacionat la memòria metabòlica amb la sobreproducció de ROS induïda per la hiperglucèmia i que s'ha reconegut com un important agonista de les complicacions clíniques associades amb la diabetis ⁶⁵. Així mateix, la glicació de les proteïnes mitocondrials pot formar part de l'explicació de la memòria metabòlica, ja que hi ha una sobreproducció de radicals lliures, independentment de la glucèmia real, que manté l'activació de les vies involucrades en la patogènia de les complicacions diabètiques ⁶⁷. En aquest sentit, la comprensió dels esdeveniments moleculars després del tractament de la RI podrà contribuir en les intervencions terapèutiques per prevenir, revertir o retardar els seus efectes nocius.

II. JUSTIFICACIÓ I HIPÒTESIS

1. JUSTIFICACIÓ

La SM es descriu com un conjunt de factors que contribueixen a un major risc per al desenvolupament de DM2 i MCV. S'ha postulat que la RI i l'obesitat abdominal són els principals factors implicats en les manifestacions d'aquesta síndrome. Com es pot observar a la literatura, avui en dia, la SM està en augment en la població general i s'ha convertit en un dels principals problemes de salut pública del segle XXI, juntament amb l'epidèmia de l'obesitat que afecta cada vegada més a les poblacions joves i que té repercussions a curt i llarg termini. Un dels principals factors del desenvolupament d'aquestes patologies és el fàcil accés i l'increment de la ingesta d'aliments d'alt valor energètic i lipídic juntament amb el sedentarisme.

La memòria metabòlica es refereix a les complicacions que es manifesten en la hiperglucèmia i que persisteixen tot i la millora del control glucèmic. Aquest fenomen pot estar relacionat amb una mala utilització de mètodes de pèrdua de pes i en els quals a més, es pot obtenir un efecte io-io. Per tant, és necessari identificar els canvis moleculars produïts en la RI i si aquests persisteixen després de la normalització de la glucèmia. De manera que, és recomanable cercar tractaments a més de la restricció energètica que permeti disminuir la permanència d'aquesta memòria metabòlica.

Per això, juntament amb el que s'ha exposat anteriorment, s'ha donat la importància de realitzar un tractament amb diferents compostos bioactius en un context de dieta hipercalòrica i normocalòrica i així poder estudiar si aquests compostos tenen efecte en la memòria metabòlica i en els danys causats per una dieta alta en greixos.

A més, un altre factor que s'ha tingut en compte en la realització d'aquesta tesi, és que existeixen resultats controvertits respecte al paper del mitocondri en el desenvolupament de la RI. Per un costat si la disfunció mitocondrial podria ser precursora de la SM i per altra banda, existeixen evidències que la SM, per si sola, indueix canvis en la funció mitocondrial. Per tant, és necessari estudiar els canvis produïts en el mitocondri i com aquests canvis afecten a la RI i si es poden millorar amb l'addició de diferents compostos bioactius.

La magnitud de la prevalença i increment a tot el món de la SM, justifiquen la realització de noves investigacions encaminades a aportar evidències sobre el tema

per suggerir estratègies que millorin l'estat de salut de la població i que permetin prevenir el risc de les complicacions metabòliques. És a dir, l'estratègia principal per a la prevenció i tractament de la SM és un canvi de l'estil de vida enfocat en l'alimentació, l'exercici físic i l'actitud cap a l'alimentació. Per tant, si aquests eixos fonamentals no es compleixen l'addició dels diferents compostos bioactius podrien contrarestar la falta d'adherència a un estil de vida saludable. S'ha seleccionat com a eines terapèutiques diferents compostos amb reconegut efecte en el tractament de la SM, com l'omega-3, fibra soluble i soja.

2. HIPÒTESIS

En base a la introducció exposada i la justificació descrita, la hipòtesis d'aquest treball es centra en que és possible realitzar una reprogramació metabòlica i una disminució de l'estrès oxidatiu amb l'addició d'omega-3, fibra soluble i soja. Aquests canvis permetran recuperar les característiques mitocondrials i metabòliques en situacions d'excés de consum energètic.

III. OBJECTIUS

1. OBJECTIU GENERAL

Avaluar l'efecte de la suplementació d'omega-3, fibra soluble i soja en el metabolisme energètic i en la memòria metabòlica, així com el seu potencial ús en la modulació del metabolisme energètic i el tractament de la SM.

2. OBJECTIUS ESPECÍFICS

- Determinar els efectes dels diferents tractaments seleccionats en la sensibilitat a la insulina mitjançant corbes de tolerància subcutània a la glucosa i a la insulina i la medició de la fructosamina com a paràmetres funcionals de la sensibilitat a la insulina. Així com en les proteïnes clau en la senyalització de la insulina (GLUT2, GLUT4, AMPK α) com mesura complementària per la valoració de la sensibilitat a la insulina.

- Analitzar els efectes dels diferents tractaments seleccionats en variables de pes i d'ingesta dietètica.

- Determinar els efectes dels diferents tractaments seleccionats en paràmetres bioquímics sanguinis relacionats amb el metabolisme lipídic (colesterol, HDL, LDL, TG).

- Estimar els efectes dels diferents tractaments seleccionats en canvis mitocondrials a través de la valoració de l'ADNmt, AMPK α , SIRT1, PGC-1 α , MFN2 i complexos mitocondrials com a marcadors de la memòria metabòlica.

- Analitzar els efectes dels diferents tractaments seleccionats en el dany oxidatiu com a marcador de dany tissular utilitzant biomarcadors de dany proteic i amb la proteïna relacionada SOD1 com a paràmetre de seguretat del tractament, tenint en compte que en un context ideal la reversió de la RI no hauria d'incrementar el dany oxidatiu en els diferents teixits.

IV. MATERIALS I MÈTODES

1. DISSENY EXPERIMENTAL

El procediment experimental es va dur a terme en un model animal de ratolí i es va dividir en dues etapes. En la primera etapa es va induir RI amb una dieta hipercalòrica i hiperlipídica i en la següent part es va realitzar un tractament nutricional amb dietes normocalòriques o amb dietes hipercalòriques i els compostos bioactius d'interès. Els nutrients a estudiar van ser la soja, la fibra soluble i els àcids grassos omega-3, els quals van ser afegits a la dieta dels ratolins.

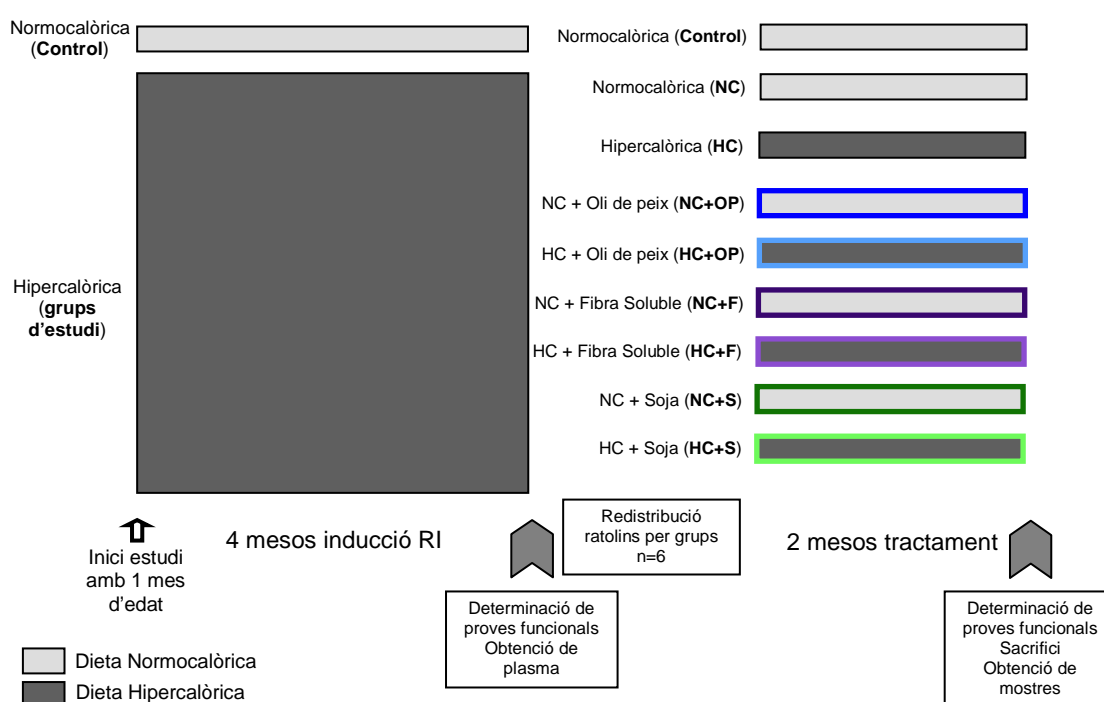


Figura 4. Esquema del procediment i dels grups experimentals duts a terme. Durant 4 mesos es va induir resistència a la insulina (RI) amb una dieta hipercalòrica (grup Control amb ingesta de dieta normocalòrica). Després dels 4 mesos es van realitzar proves funcionals per determinar la sensibilitat a la insulina. Els ratolins es van dividir en 9 grups de 6 ratolins i es va procedir a 2 mesos de tractament nutricional amb una dieta normocalòrica o hipercalòrica amb el compost bioactiu a estudiar. Finalitzats els 2 mesos de tractament es van realitzar proves funcionals de sensibilitat a la insulina i es van sacrificar els ratolins per l'obtenció de les mostres a analitzar.

En la Figura 4 s'esquematitza el disseny experimental. A l'inici de l'estudi els ratolins amb 1 mes de vida es van dividir en 2 grups. Se'ls hi va administrar una dieta normocalòrica (grup Control n=6) o una dieta hipercalòrica i hiperlipídica (n=48) durant 4 mesos amb la finalitat d'induir RI als ratolins. Es va fer un control de dieta i de pes setmanal. Al finalitzar el període de 4 mesos es van realitzar proves funcionals de tolerància a la glucosa i se'ls hi va extreure plasma per la quantificació de fructosamina. El grup amb RI es va distribuir de forma aleatòria en base al pes del

ratolí en 8 grups diferents. L'esquema de l'experiment va quedar com es mostra en la Figura 4. Realitzada la distribució dels ratolins es va continuar amb 2 mesos de tractament nutricional, que consistia amb una dieta normocalòrica o hipercalòrica i hiperlipídica amb el compost bioactiu a estudiar. Finalitzats els 2 mesos de tractament es van realitzar proves funcionals de sensibilitat a la insulina (corba de tolerància a la glucosa i resposta glucèmia a la insulina) i es van sacrificar els ratolins per l'obtenció de les mostres a analitzar.

1.1. INTERVENCIÓ DIETÈTICA

L'objectiu principal és avaluar la capacitat de revertir la RI (induïda amb l'addició de llard de porc i l'augment de sucres per aconseguir una dieta alta en greixos i en contingut calòric), així com avaluar els canvis observats en el mitocondri mitjançant la suplementació amb compostos bioactius tant en dieta normocalòrica com hipercalòrica i hiperlipídica. Per avaluar l'objectiu d'aquesta tesi es va simular un programa dietètic de reducció de pes més la suplementació del compost bioactiu (dieta normocalòrica + compost bioactiu) i a través de la suplementació del compost bioactiu sense tractament dietètic (dieta hipercalòrica + compost bioactiu).

1.2. PREPARACIÓ DE LES DIETES

Per estudiar l'efecte dels àcids grassos omega-3, fibra soluble i soja en un model de ratolí les dietes es van preparar manualment al laboratori. Els diferents tipus de dieta a preparar van ser dieta normocalòrica, dieta hipercalòrica i hiperlipídica i la combinació d'aquestes dietes amb el compost d'estudi, en total 9 grups d'estudi. L'eliminació de l'aigua de les dietes es va realitzar per liofilització. Els compostos que es van incloure a la dieta van ser oli de peix (fish oil from menhaden fish, F8020, Sigma, USA), fibra soluble (cutícules de llavors de Plantago Ovata, Madaus, Espanya) i beguda de soja (Vivesoy, Pascual, Espanya), en unes concentracions que simulaven els requeriments nutricionals en humans o la quantitat en dietes equilibrades:

- a) L'addició de beguda de soja respecte la ingesta mitjana de isoflavones en humans (50 mg/dia) ⁶⁸.
- b) L'addició de cutícules de llavors de Plantago Ovata respecte la recomanació de fibra soluble en humans (9 g/dia) tenint en compte que al voltant del 30% de la ingesta de fibra (30 g/dia) ha de ser soluble ⁶⁹

- c) La suplementació amb oli de peix respecte la recomanació d'àcids grassos omega-3 en humans (500 mg/dia) ⁷⁰.

En la Taula 2 es descriu la composició de les diferents dietes indicant els grams de cada producte per preparar un kg de dieta. En la Taula 3 es presenten els valors de la composició nutricional de cada dieta, indicant el contingut en energia, proteïnes, hidrats de carboni i lípids. En cada capítol s'indica la descripció nutricional de l'ingredient afegit a la dieta.

Taula 2. Composició de les dietes dels grups experimentals en la intervenció nutricional.

	Control	HC	NC+OP	HC+OP	NC+F	HC+F	NC+S	HC+S
Caseïna (g/kg)	245	245	245	245	245	245	235	235
L-cisteïna (g/kg)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Midó de blat de moro (g/kg)	302	85	302	85	265	68	297	79
Sacarosa (g/kg)	174	200	174	200	153	159	164	191
Llard de porc (g/kg)	0	250	0	250	0	250	0	250
Oli de blat de moro (g/kg)	109	90	55	36	109	90	103	84
Cel·lulosa (g/kg)	58	58	58	58	58	58	56	56
Minerals (Mix) (g/kg)	43	43	43	43	43	43	43	43
Fosfat de calci (g/kg)	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
Vitamines (Mix) (g/kg)	19	19	19	19	19	19	19	19
Bitartrat de colina (g/kg)	3	3	3	3	3	3	3	3
Ingredient afegit			54 g d'oli de peix	54 g d'oli de peix	58 g de fibra soluble	58 g de fibra soluble	340 mL de beguda de soja	340 mL de beguda de soja

Dieta adaptada per garantir una aportació nutricional òptima en el cas de la dieta normocalòrica i una aportació del 60% de greix en el cas de la hipercalòrica com s'utilitza en la majoria d'estudis amb dietes hipercalòriques. Control: dieta normocalòrica, HC: dieta hipercalòrica, NC+OP: dieta normocalòrica amb l'addició d'oli de peix, HC+OP: dieta hipercalòrica amb l'addició d'oli de peix, NC+F: dieta normocalòrica amb l'addició de fibra soluble, HC+F: dieta hipercalòrica amb l'addició de fibra soluble, NC+S: dieta normocalòrica amb l'addició de beguda de soja, HC+S: dieta hipercalòrica amb l'addició de beguda de soja.

Taula 3. Composició en macronutrients de les dietes ingerides pels grups experimentals en la intervenció nutricional.

	Control	HC	NC+OP	HC+OP	NC+F	HC+F	NC+S	HC+S
kcal/g	3,88	5,19	3,88	5,19	3,65	4,96	3,88	5,19
Proteïna g/kg	249	249	249	249	249	249	249	249
% kcal	26	19	26	19	27	20	26	19
Hidrat de Carboni g/kg	476	285	476	285	418	227	476	285
% kcal	49	22	49	22	46	18	49	22
Greix g/kg	109	340	109	340	109	340	109	340
% kcal	25	59	25	59	27	62	25	59

Control: dieta normocalòrica, HC: dieta hipercalòrica, NC+OP: dieta normocalòrica amb l'addició d'oli de peix, HC+OP: dieta hipercalòrica amb l'addició d'oli de peix, NC+F: dieta normocalòrica amb l'addició de fibra soluble, HC+F: dieta hipercalòrica amb l'addició de fibra soluble, NC+S: dieta normocalòrica amb l'addició de beguda de soja, HC+S: dieta hipercalòrica amb l'addició de beguda de soja.

1.3. ANIMALS

Es van utilitzar un total de 54 ratolins mascles HCD/CD1 Swiss amb un pes promig de $32,4 \pm 2,9$ g amb 4 setmanes d'edat, els quals es van obtenir de Harlan Laboratories (Barcelona, Espanya). En tots els grups, els ratolins es van engabiar individualment i es van mantenir a 23 ± 1 °C amb una humitat relativa de $50 \pm 10\%$ i amb un cicle de llum:fosc de 12:12h. Tots els grups van rebre aigua i dieta ad-libitum. Setmanalment es va controlar la ingesta i el pes dels ratolins.

2. MATERIALS I MÈTODES

2.1. PROCEDIMENTS

Durant tot el temps d'experimentació es va fer un control setmanal de pes i de dieta. Després dels 4 mesos de dieta d'inducció a RI, se'ls va practicar un test de tolerància subcutània a la glucosa (ScGTT) i se'ls va extreure sang venosa de la cua per determinar la fructosamina. Després dels 2 mesos de tractament, se'ls va tornar a practicar un test de tolerància a la glucosa i de sensibilitat a la insulina. Tots els procediments amb els animals van seguir els protocols aprovats pel comitè institucional de cura i ús d'animals i els experiments van ser aprovats pel comitè d'ètica de la Universitat de Lleida (CEEA 18–01/12).

2.1.1. Corba de glucosa

Per a la valoració d'aquesta prova, els animals es van deixar en dejú durant 6 hores. La prova es va realitzar per la tarda com a consonància de la seva cronobiologia. Les dosis de glucosa a injectar van ser de 2 g/kg de pes. Els canvis de glucèmia van ser registrats als 0, 20, 40, 60 i 120 minuts per mitjà de punció venosa a la cua i la glucèmia va ser registrada per un glucòmetre AccuCheck (Roche, Barcelona, Espanya).

2.1.2. Corba d'insulina

Per a la valoració d'aquesta prova, els animals es van deixar en dejú durant 2 hores. La prova es va realitzar per la tarda com a consonància de la seva cronobiologia. La dosi d'insulina (solució d'insulina de pàncrees boví, I0516, Sigma, EUA) a injectar va ser de 0,5 U/kg de pes. Els canvis de glucèmia van ser registrats als 0, 20, 40, 60 i 120 minuts per mitjà de punció venosa a la cua i la glucèmia va ser registrada per un glucòmetre AccuCheck (Roche, Barcelona, Espanya).

2.1.3. Sacrifici i obtenció de mostres

Una vegada finalitzat el període d'experimentació, els ratolins es van deixar en dejú d'aliment sòlid durant 6 hores i es van sacrificar per decapitació. La sang es va recollir per mitjà de tubs heparinitzats per l'obtenció de plasma. Se'ls va extreure múscul, fetge i teixit adipós i el contingut cecal i es van recollir les femtes. Totes les mostres van ser congelades immediatament amb nitrogen líquid i emmagatzemades a -80°C pels anàlisis.

2.2. ANÀLISIS DE LES MOSTRES

2.2.1. Paràmetres de bioquímica sanguínia relacionats amb el metabolisme

Per a determinar els paràmetres bioquímics fructosamina, colesterol total, LDL, HDL, triglicèrids i àcid úric es van utilitzar els kits d'anàlisi proporcionats per Spinreact (1001158, 1001091, 41023, 1001098, 1001310, 1001010 respectivament Girona, Espanya).

2.2.2. Determinació de la capacitat antioxidant en plasma. FRAP

L'assaig de reducció del ferro/capacitat antioxidant es va dur a terme segons es troba descrit per Benzie i Strain ⁷¹. Per a preparar el reactiu FRAP; es va mesclar 2,5 mL d'una solució 10 mM TPTZ en 40 mM HCl amb 2,5 mL de 20 mM FeCl₃·H₂O i 25 mL de 0,3 M de tampó acetat. Es va barrejar 900 µL del reactiu FRAP amb 90 µL d'aigua destil·lada i amb 30 µL de la mostra. Es va mesurar l'absorbància a 595 nm

utilitzant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem). Es va utilitzar una corba patró de trolox (100-1000 μ M) i els resultats van ser expressats en μ mols equivalents de trolox.

2.2.3. Contingut carbohidrats en femta i en el contingut cecal

La femta i el contingut cecal es van liofilitzar i seguidament van ser homogeneïtzats per poder quantificar el contingut en carbohidrats per matèria seca. Els carbohidrats totals es van determinar després de la hidròlisi amb àcid sulfúric amb el mètode Englyst i Cummings ⁷². Per realitzar aquest mètode es va utilitzar com a estàndard la glucosa i es va afegir a 0,5 mL de mostra 0,25 mL de NaOH 3,9 M i 1 mL de reactiu colorimètric (en 1 litre hi ha 10 g d'àcid 3,5-dinitrosalicílic, 16 g de NaOH i 300 g de tartrat sòdic-potàssic tetrahidratat), es va incubar durant 10 minuts a 100°C i es va afegir 10 mL d'aigua. D'aquesta mescla es van addicionar 0,2 mL a una microplaca per llegir l'absorbància a 530 nm utilitzant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem).

2.2.4. Western-blot

La tècnica de western-blot va ser utilitzada per avaluar les proteïnes mitocondrials i les proteïnes relacionades amb la via de la senyalització de la insulina i el metabolisme energètic. Es van avaluar les proteïnes glucose transporter type 4 (GLUT4) i type 2 (GLUT2), 5' AMP-activated protein kinase (AMPK α), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α) i NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (SIRT1) que estan implicades amb el metabolisme energètic i la biogènesi mitocondrial. També es van analitzar els complexos mitocondrials i porina i mitofusin-2 (MFN2) per estudiar la fusió mitocondrial i així poder analitzar si hi ha adaptacions mitocondrials. Finalment es va estudiar la proteïna superoxide dismutase (SOD1), proteïna involucrada en l'estrès oxidatiu i l'expressió de B-cell lymphoma 2 (BCL2) per estudiar la inducció d'apoptòsis. A continuació es detallen els procediments duts a terme per realitzar la tècnica de western-blot.

2.2.4.1. Homogeneïtzació dels teixits

Uns 50 mg de teixit van ser homogeneïtzats en 500 μ L de tampó d'homogeneïtzació que contenia 180 mM de clorur de potassi, 5 mM de 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 2 mM de EDTA, 1 mM de ethyl-triamine-penta acetic acid, BHT 1 μ M, fluorur de sodi 1 mM, ortovanadato de sodi 1 mM i 1,5% de inhibidor de proteases 100x (Thermo Scientific). L'homogeneïtzació es va dur a terme amb un Ultra-Turrax (3420000 IKA, Alemanya).

2.2.4.2. Quantificació de proteïnes

Per determinar la quantitat de proteïna es va utilitzar el mètode Bradford ⁷³. En les mostres homogeneïtzades va ser necessari realitzar una dilució prèvia de 1:20. Per aquest procediment es va utilitzar una alíquota de 3 µL de la dilució prèvia, 157 µL d'aigua milliQ i 40 µL del reactiu de Bradford (Protein Assay #500-0006 Bio-Rad, Munich, Alemanya). Es va barrejar amb el multipipetor, es va deixar reaccionar durant 10 minuts i es va llegir l'absorbància a 595 nm utilitzant un lector de microplaques (Multiskan ascent 354, Thermo Labsystem). Es va quantificar la concentració de proteïna de la mostra per comparació amb la recta patró de la proteïna albúmina sèrica bovina a una concentració de 0 a 0.025 µg/µL.

Per la immunodetecció de les proteïnes es va realitzar un pool de les mostres de cada grup que contenia quantitats similars de proteïna. La solució de carga va contenir 40 µg de proteïna en 10 µl, un 25% de tampó Laemmli i aigua per ajustar la quantitat de proteïna.

2.2.4.3. Electroforesi i transferència

Un cop preparades les mostres, es van separar les proteïnes per electroforesi utilitzant gels d'acrilamida (PAGE) en cubetes d'electroforesi tipo Mini-PROTEAN II (ref. 165-2940 de BioRad, Barcelona, Espanya).

Taula 4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per la immunodetecció per western-blot

Anticòs	Proveïdor	Referència	Dilució
GLUT4	Abcam	ab654	1:2500
GLUT2	Abcam	ab104622	1:500
AMPKα	Cell Signaling	2532	1:1000
PGC-1α	Cayman	101707	1:500
SIRT1	Millipore	07-131	1:1000
MFN2	Sigma Aldrich	M6319	1:1000
Porina	Molecular Probes	a31855	1:5000
Complex I (NDUFA9 subunitat nuclear)	Molecular Probes	a21344	1:1000
Complex II (P21912 subunitat nuclear)	Molecular Probes	a11142	1:1000
Complex III (FeS-OXPhos subunitat nuclear)	Molecular Probes	a21346	1:1000
Complex IV (MTCO1 subunitat mitocondrial)	Molecular Probes	459600	1:1000
SOD1	Abcam	ab52950	1:5000
BCL2	Sigma Aldrich	SAB4500003	1:500
Anti-mouse IgG	Amersham	NA931V	1:30000
Anti-rabbit IgG	Pierce	31460	1:100000

Una vegada separades les proteïnes per pes molecular, es van transferir a membranes de nitrocel·lulosa de bifluorur de polivinil (PVDF) (Immobilion-P #IPVH00010 Millipore, Millford, MA, EUA), la transferència es va realitzar en cubetes de transferència (Mini Trans-Blot Transfer Cell de BioRad Laboratories, Barcelona, Catalunya). Un cop es van acabar de transferir les proteïnes del gel a la membrana, es van incubar en una solució de bloqueig (0,2% I-Block™ reagent, 1x PBS, 0,1% Tween-20® i aigua destilada fins a 100 mL) i seguidament es van incubar amb l'anticòs primari i secundari. Els anticossos utilitzats es detallen en la Taula 4.

2.2.4.4. Revelat i quantificació

Per revelar la membrana es va incubar durant 5 minuts a temperatura ambient amb un substrat quimioluminescent (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate). Es revela amb l'equip Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad, Munich, Alemanya) utilitzant el programa Quantity-One 4.6 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La quantitat de luminescència obtinguda és proporcional a la quantitat d'anticòs primari unit a la proteïna d'interès. S'utilitza com a marcador de carga total el Ponceau.

2.2.4.5. Normalització de la Carga

Es va utilitzar el mètode Ponceau per comprovar l'èxit de la transferència i com a marcador de carga total de proteïna per tenir en compte alhora de quantificar les membranes. La membrana es va rentar amb TBST, es va incubar durant 5 minuts amb la solució de Ponceau (0,1% (w/v) en àcid acètic al 5%) i es va rentar amb aigua. Les bandes es van analitzar colorimètricament a l'equip Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad, Munich, Alemanya) i es va quantificar la intensitat de color des del pes molecular 20 al 120.

2.2.5. Quantificació del dany oxidatiu proteic

Per a la determinació de l'estrès oxidatiu als teixits en els diferents tractaments nutricionals es va quantificar el dany oxidatiu proteic. Aquestes determinacions es van realitzar per cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS). Seguidament es detallen els procediments que es van dur a terme per realitzar aquesta tècnica.

2.2.5.1. Preparació de la mostra

Es va extreure la fracció lipídica amb cloroform:metanol (2:1, v/v) (Folch, Lees & Sloane Stanley 1957) d'una alíquota de mostra de 500 µg de proteïna total. Es va precipitar tota la proteïna afegint àcid tricloroacètic al 10% (a concentració final) i

centrifugant a 4000 rpm durant 15 min a 4°C. Seguidament es van reduir les mostres incubant-les tota la nit amb una solució reductora (1 mL de borhidrur sòdic 500 mM dissolt amb un tampó d'àcid bòric 0,2 M a pH 9.2). A aquesta solució es va afegir una gota d'hexanol com agent antiespumant. Les proteïnes es van reduir amb borhidrur sòdic per estabilitzar els adductes per a la posterior hidròlisis àcida. Després d'un mínim de 12 hores les proteïnes es van reprecipitar afegint 1 mL d'àcid tricloroacètic al 10% (concentració final) i es va centrifugar. A les mostres reduïdes es van afegir els estàndards interns deuterats marcats isotòpicament [$^2\text{H}_8$]Lisina (120 nmols), [$^2\text{H}_4$]CML (474 pmols), [$^2\text{H}_4$]CEL (432 pmols), [$^2\text{H}_8$]MDA-Lisina (216 pmols), [$^2\text{H}_5$]AHAV (648 pmols) i [$^2\text{H}_4$]HACA (140 pmols) i es van sotmetre a hidròlisis afegint 1 mL d'àcid clorhídric 6 N i incubant a 155 °C durant 30 min a un bany sec (Tembloc Selecta, Barcelona, Espanya). Els hidrolitzats que es van obtenir es van evaporar al buit (SPD121P Speed Vac Savant, Barcelona, Espanya). Els derivats N,O-trifluoroacetil dels èsters metílics de l'hidrolitzat de proteïnes es van obtenir de la següent manera: 1) incubació dels èsters metílics de l'hidrolitzat amb 1 mL de metanol-àcid clorhídric al 5% durant 30 min a 65 °C seguit d'evaporació sota flux de nitrogen (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA) per obtenir els èsters metílics. La solució de metanol-àcid clorhídric es va preparar mitjançant l'addició de clorur d'acetil sobre el metanol, amb l'objectiu de produir àcid clorhídric anhidro. 2) incubació dels èsters metílics de l'hidrolitzat amb 1 mL d'àcid trifluoroacètic anhidro durant 1 h i posteriorment es va evaporar sota flux de nitrogen (N-evap Model 113 Organomation Association, Berlin, MA, EUA). Per últim, les mostres es van dissoldre amb 80 µL de diclorometà com a vehicle pel posterior anàlisis mitjançant cromatografia de gasos acoblat a espectrometria de masses.

2.2.5.2. Sistema cromatogràfic

L'anàlisi es va realitzar mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses. El cromatògraf de gasos utilitzat va ser el model 6890 de Hewlett-Packard (Barcelona, Espanya) equipat a una columna capil·lar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) i acoblat a un espectròmetre de masses model 5973A en el mode d'impacte iònic de Hewlett-Packard (Barcelona, Espanya).

2.2.5.3. Condições cromatogràfiques

El port d'injecció es va mantenir a 275 °C i el programa de temperatura va consistir amb el següent: 5 min a 110°C, després augmenta 2 °C/min fins a 150 °C, 5 °C/min fins a 240 °C, 25 °C/min fins a 300 °C i un manteniment final a 300 °C durant 5 min. Es van injectar 2 µL de mostra en cada cursa cromatogràfica.

2.2.5.4. Quantificació dels analits

La quantificació es va realitzar mitjançant una estandardització externa utilitzant corbes patró construïdes a partir de la mescla d'estàndards interns deuterats i no deuterats: $[^2\text{H}_8]$ Lisina, CML, $[^2\text{H}_2]$ CML, CEL, $[^2\text{H}_4]$ CEL, MDAL $[^2\text{H}_8]$ MDA-Lisina, AHAV, $[^2\text{H}_5]$ AHAV, 2SC i $[^2\text{H}_2]$ -2-SC. Aquests estàndards interns utilitzats van ser prèviament sintetitzats al grup a excepció del $[^2\text{H}_2]$ CML, $[^2\text{H}_4]$ CEL, 2-SC i $[^2\text{H}_2]$ -2-SC que es van comprar (SC1529, SC1564, SP101215 i SP110026 respectivament, PolyPeptide Group, França). Els anàlisis es van realitzar mitjançant la monitorització d'ions específics seleccionats prèviament (SIM, de l'anglès, *selected ion monitoring*). Els analits es van detectar per SIM-GC/MS. Els ions que es van utilitzar i la seva descripció química es presenten en la Taula 5. Les concentracions finals es van expressar amb μmols de CML, CEL, MDAL, GSA, 2-SC/mols de lisina.

Taula 5. Relació dels ions de m/z d'analits mesurats mitjançant GC/MS.

Estàndard	Nomenclatura química de l'estàndard	Ió (m/z)
lisina	Lisina	180
$[^2\text{H}_8]$ lisina	d_8 -L-lisina	187
CML	N ^ε -carboximetil-D,L-lisina	392
$[^2\text{H}_2]$ CML	N ^ε -carboximetil- d_4 -D,L-lisina	394
CEL	N ^ε -carboxietil-D,L-lisina	379
$[^2\text{H}_4]$ CEL	N ^ε -carboxietil- d_4 -D,L-lisina	383
AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-aminovalèric	280
$[^2\text{H}_5]$ AHAV*	Àcid 5-hidroxi-2-amino- d_5 -valèric	285
MDAL	Malondialdehid-lisina	474
$[^2\text{H}_8]$ MDA-Lisina	Malondialdehid-lisina- d_8 -L-lisina	482
2-SC	S-(2-Succinil)-Cisteïna	244
$[^2\text{H}_2]$ -2-SC	S-(2-Succinil)- d_2 -Cisteïna	286

*El producte de l'oxidació és la molècula semialdehid glutàmic (GSA), però l'analit que es detecta al cromatògraf és el seu derivat després de la reducció AHAV.

2.2.6. Quantificació de l'ADNmt

El contingut d'ADNmt es va quantificar per qPCR utilitzant la relació entre ADNmt i ADNnuclear per poder avaluar el contingut mitocondrial. El protocol d'anàlisis es descriu a continuació.

2.2.6.1. Extracció de l'ADN

L'extracció de l'ADN dels diferents teixits es va fer d'acord amb el protocol del kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). L'ADN s'obté gràcies a una digestió amb proteïnasa K a 55 °C utilitzant un tampó de digestió que ajuda a desnaturalitzar les proteïnes i augmenta l'activitat de la proteïnasa K. Seguidament es va eliminar l'ARN residual amb una digestió amb RNasa. Després el llisat es va barrejar amb

etanol i el tampó d'unió que permet la unió de l'ADN a la membrana de la columna. Finalment es van eliminar les impureses amb un tampó de rentat i l'ADN es va eluir amb el tampó d'elució.

2.2.6.2. Quantificació de la concentració de l'ADN per Nanodrop®

Per quantificar l'ADN es van recollir els valors tant de la concentració de les mostres com de les relacions 260/280 i 260/230 que aporten informació de la puresa de l'ADN extret. Per comprovar la integritat de l'ADN extret, es va verificar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa tenyit amb colorant fluorescent (SYBR Safe).

2.2.6.3. Quantificació dels nivells d'ADNmt

Es va realitzar una real-time PCR dins del sistema de detecció de la seqüència ABI PRISM 7300HT i utilitzant el master mix TaqMan Universal PCR (Bio-Rad Cat. 172-5131). Per quantificar l'ADNmt, es van necessitar 100 ng de l'ADN total i es va utilitzar com a marcador d'ADNmt el cytochrome b (cytb) (Mn 04225271_g1 de Custom TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, UK). La quantificació de l'ADNmt es va referir a l'ADN nuclear segons el que va determinar l'amplificació del gen sense introns β -actina (actb) (Mn00607939_s1 de Custom TaqMan Gene Expression Assays; Applied Biosystems, UK) utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta C_t}$).

2.3. ANÀLISIS ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic es va realitzar mitjançant el software GraphPad Prism5. Com a prova estadística per la valoració de les diferències entre les mitjanes dels grups experimentals es van analitzar mitjançant un anàlisi de la variància d'una via (ANOVA). Com a post-hoc és va utilitzar el mètode Turkey (per comprar totes les columnes). S'han considerat totes les distribucions normals. Per l'anàlisi de les corbes de glucosa s'utilitza un anàlisi de variància de dos vies (temps i tractament). Per a l'anàlisi del contingut de proteïnes específiques i l'ADNmt on s'ha realitzat un pool de la mostra es presenta com a error típic, per a tots els altres anàlisis s'ha realitzat la desviació estàndard. El nivell de la $p < 0.05$ va ser el punt de significació estadística mínima en cada comparació i es va representar gràficament amb * en el cas de $p < 0.05$, ** en el cas de que la $p < 0.01$ o *** en el cas de que la $p < 0.001$.

V. RESULTATS

V.1. Efecte de l'adequació energètica

A. MODEL D'INDUCCIÓ DE RESISTÈNCIA A LA INSULINA. DIETA HIPERCALÒRICA I HIPERGRASSA

Està descrit que la RI provoca canvis en el mitocondri, augmentant la disfunció mitocondrial i disminuint el nombre de mitocondris ^{39,47,49,50}. A més s'ha documentat que ratolins alimentats amb dieta hipergrassa durant 16 setmanes presentaven una alteració en el teixit muscular en la biogènesi mitocondrial, estructura i funció ³³, indicant que l'acumulació de lípids ectòpics en els teixits sensibles a la insulina pot ser un mecanisme subjacent a la RI ⁷⁴, sent la conseqüència d'una disminució de la funció mitocondrial. Considerant això, es va induir RI amb una dieta hipercalòrica i hipergrassa (durant aquest treball s'anomenarà hipercalòrica (HC)) als ratolins per poder-los utilitzar com a model de SM i poder identificar els canvis produïts després d'un tractament nutricional.

Per estudiar els efectes de la dieta hipercalòrica sobre el pes corporal, la ingesta alimentària i la ingesta energètica, es va realitzar un control setmanal de pes i de dieta als ratolins. El pes dels ratolins a l'inici de l'estudi va ser de $33,3 \pm 1,8$ g en el grup Control i de $32,3 \pm 3,0$ g en el grup amb dieta hipercalòrica. A les 16 setmanes de dieta, el pes va ser de $49,7 \pm 7,4$ g en el grup Control i $59,9 \pm 8,2$ g en el grup amb dieta hipercalòrica. Tal i com s'observa en la Figura 5 el pes corporal va ser significativament major en els ratolins amb una dieta hipercalòrica a les 16 setmanes. També s'observa que la dieta ingerida en el grup amb dieta hipercalòrica és significativament menor, no obstant això, al normalitzar la quantitat de dieta per les calories ingerides, no es va evidenciar una diferència significativa en la ingesta energètica entre els dos grups, ja que els ratolins amb la dieta hipercalòrica van tenir la capacitat de regular la seva ingesta energètica tot i que van augmentar significativament el seu pes respecte el grup Control. Per tant, a una quantitat similar d'energia, el percentatge del contingut de macronutrients de la dieta influeix en els canvis del pes corporal. A més, s'ha estudiat en rosegadors, com aquests tendeixen a mantenir la seva ingesta d'energia a una velocitat relativament fixa ⁷⁵ i tenen la capacitat de regular la seva ingesta d'aliments en termes de grams totals per mantenir la ingesta calòrica comparant amb una dieta estàndard ⁷⁶.

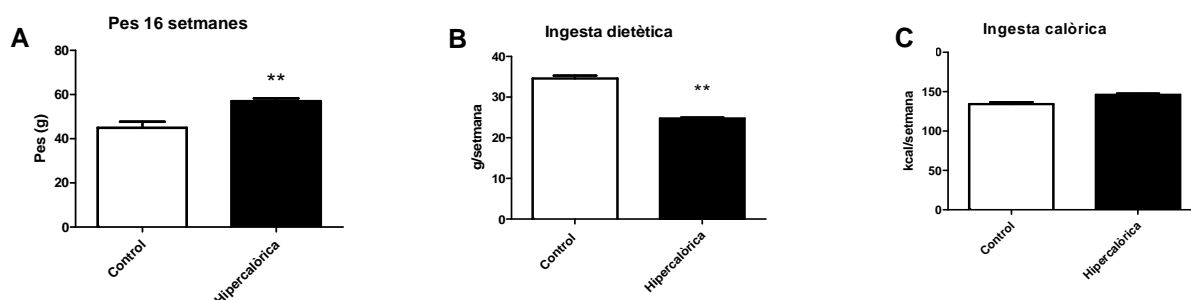


Figura 5. Pes i Ingesta dietètica i calòrica després de la inducció de la RI.

Pes (g) (A), Ingesta dietètica (g/setmana) (B) i Ingesta calòrica (kcal/setmana) (C) a les 16 setmanes d'inducció de la RI. Els valors marcats mostren diferències significatives entre el control ($p < 0.01$).

Respecte l'increment de pes, els ratolins amb la ingesta de dieta hipergrassa amb un 60% de greix, van experimentar un 20% més de pes respecte al Control a les 16 setmanes. No obstant això, en un estudi van observar que els ratolins que van ingerir una dieta amb un contingut del 60% de greix, a les 18 setmanes, el pes corporal va augmentar un 36% més respecte el Control ⁷⁷. La diferència entre aquest estudi es deu a que el grup amb una dieta estàndard tenia un 13,5% de greix mentre que la dieta del Control del present estudi contenia un 25% de greix, contribuint així a un major augment de pes.

Al finalitzar el període de 16 setmanes es va realitzar una corba de glucèmia per determinar el grau de RI. Es va extreure sang venosa de la cua del ratolí per mesurar la fructosamina que és un marcador de la glucèmia format a través de processos no enzimàtics que impliquen la glicosilació de les proteïnes sèriques per formar cetoamines ⁷⁸ i per tant mostra el control de la glucèmia sanguínia a curt termini. Per realitzar la corba de glucèmia es va mesurar la quantitat de glucèmia sanguínia a diversos temps (0, 20, 40, 60 i 120 minuts) després de la injecció de 2 g de glucosa per kg de pes del ratolí. En la Figura 6 no s'observa una diferència significativa en la glucèmia basal. No obstant això, els ratolins amb una dieta hipercalòrica mantenen uns nivells de glucèmia més elevats després de la injecció de glucosa, sent la diferència significativa en el minut 120 que correspon amb l'últim punt de la corba. Aquests valors es poden veure reflectits en l'àrea sota la corba glucèmica, on en el grup amb dieta hipercalòrica mostra un augment significatiu del 26% en la AUC (Àrea sota la corba). A més els valors de fructosamina mostren un augment significatiu del 20% en el grup amb dieta hipercalòrica respecte el Control. En base a aquests resultats podem afirmar que els ratolins amb la dieta hipercalòrica disminueixen la capacitat de regular els nivells de glucosa en sang, possiblement a causa d'un increment de la RI. Per tant, després de les 16 setmanes d'alimentació

amb una dieta hipercalòrica, es va establir un model animal que va mostrar un increment del 20% de pes sobre el Control i una disminució de la sensibilitat a la insulina tal i com es mostra en la corba de glucosa i en els nivells de fructosamina (Figura 6), així doncs afectant el metabolisme de la glucosa. En estudis anteriors s'ha observat que la dieta hipercalòrica i hipergrassa en animals pot afectar el metabolisme de la glucosa ^{57,79}. Per tant, aquest model de guany de pes induït amb la dieta és comunament utilitzat com anàleg de la SM humana, ja que és capaç d'induir obesitat, intolerància a la glucosa i inflamació ⁷⁶ i a més la major part dels casos de DM2 o SM en humans són per desequilibris energètics com el model utilitzat.

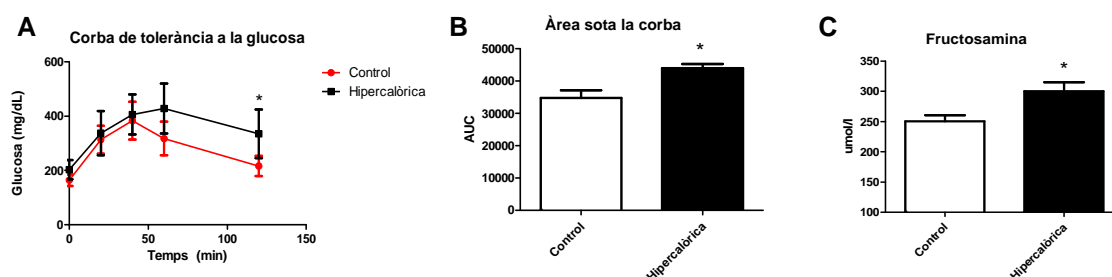


Figura 6. Tolerància a la glucosa després de la inducció de la RI.

Corba de tolerància a la glucosa (mg/dL) (A), àrea sota la corba (B), Fructosamina (C) a les 16 setmanes d'inducció de la RI. Els valors marcats mostren diferències significatives amb el control ($p < 0.05$).

Un cop obtingut el model animal insulinoresistent, un dels objectius principals d'aquesta tesi va ser evidenciar l'efecte d'un tractament nutricional que consisteix en una alimentació amb dieta normocalòrica durant 2 mesos per simular un programa dietètic de reducció de pes. Com a control negatiu del tractament, un grup continuarà amb la dieta hipercalòrica durant 2 mesos.

El que es pretén estudiar és si en aquest període, la dieta normocalòrica, és capaç de revertir els efectes en el mitocondri produïts per una dieta hipercalòrica. Es van avaluar els canvis en la funció mitocondrial i es va voler observar si aquests canvis estan relacionats amb el metabolisme de la glucosa o al contrari, que hi hagi una millora dels paràmetres relacionats amb el metabolisme de la glucosa però que no s'observi una recuperació de la funció mitocondrial relacionada amb la memòria metabòlica.

B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB DIETA NORMOCALÒRICA

1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC

Durant les 8 setmanes de tractament es va realitzar un control setmanal de pes i d'ingesta dels ratolins per poder estudiar els efectes de la dieta sobre el pes corporal, la ingesta alimentària i la ingesta energètica. Al finalitzar el tractament dietètic es va recol·lectar el plasma dels ratolins per estudiar el perfil lipídic.

En la Taula 6 es presenten els valors del pes, de la dieta ingerida i dels paràmetres bioquímics relacionats amb el metabolisme lipídic. Com és evident el pes inicial dels ratolins Control és menor, ja que aquests han tingut des de l'inici una dieta normocalòrica, en canvi els altres dos grups ja parteixen d'un pes més alt. Si s'observa el pes inicial i el pes final de l'experiment, tot i que el pes inicial del Control és menor que el grup HC, els dos tenen el mateix increment de pes, 4,8 i 5,8 g respectivament. En canvi en el grup NC, hi ha una disminució de 3 g de pes, sent la diferència significativa amb els altres dos grups. Per tant, el pes final en els dos grups amb dieta normocalòrica gairebé és el mateix, havent una normalització del pes en els ratolins que anteriorment ingerien una dieta hipercalòrica.

Respecte al consum alimentari per pes del ratolí, el grup HC ingereix una quantitat significativament menor. En canvi quan es normalitza la ingesta per les calories consumides, no s'observen diferències significatives entre grups. Tot i que hi ha una tendència a la disminució de calories en el grup NC respecte els altres grups. Es podria atribuir que aquest canvi de dieta fa que els ratolins ingereixin una menor quantitat calòrica, ja que no augmenten el volum de dieta per normalitzar les calories i juntament amb la composició en macronutrients hi hagi una pèrdua de pes. Probablement no normalitzen el volum d'aliment per calories, ja que s'ha estudiat que els ratolins tenen canvis compensatoris en la despesa metabòlica al canviar la dieta i que la seva aportació calòrica no necessàriament hagi d'augmentar⁸⁰. A més, també es pot suggerir que la despesa energètica del ratolí podria estar repartida entre la ingesta dietètica i les seves reserves energètiques.

Pel que fa al metabolisme dels lípids, es van analitzar el contingut de colesterol total, HDL, LDL i TG. Encara que no s'observen diferències significatives en el perfil

lipídic, hi ha una tendència en la disminució del colesterol total en el grup NC. Relacionat amb la despesa energètica, s'observa una disminució del consum energètic amb una tendència a l'augment dels TG que es podria relacionar a l'augment de la mobilització d'energia.

Taula 6. Guany de pes corporal, consum alimentari i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

	Control	NC	HC
Pes inicial (g)	49,8±8,9	59,1±9,3	58,8±8,7
Pes final (g)	54,6±12,7	55,9±8,0	64,7±9,8
Guany pes corporal (g)	4,8±4,1	-3,2±2,5 ^{a**}	5,8±1,4 ^{b**}
Consum d'aliment (g dieta setmana/g de pes animal)	0,69±0,12	0,55±0,06	0,47±0,11 ^{a**}
Consum energètic (kcal setmana/g de pes animal)	2,67±0,47	2,13±0,23	2,79±0,67
Colesterol total (mg/dL)	215,5±60,6	188,6±55,5	239,0±60,7
HDL (mg/dL)	120,4±22,5	106,1±24,1	117,5±23,4
LDL (mg/dL)	91,7±25,2	114,8±38,2	104,1±25,3
TG (mg/dL)	69,1±22,8	74,5±16,6	63,2±20,3
HDL/Col. Total	0,59±0,11	0,58±0,08	0,53±0,09
HDL/LDL	1,32±0,24	1,18±0,48	1,16±0,27

S'observen diferències estadísticament significatives en el pes corporal i el consum calòric entre els grups. No s'observen diferències significativament estadístiques en el perfil lipídic. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001. a amb respecte a Control, b comparant NC i HC). Les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL s'han calculat en base als resultats individuals.

Després d'analitzar el pes, la ingesta calòrica i el perfil lipídic, es va analitzar la sensibilitat a la insulina dels ratolins. Per això, al punt final de l'experiment es va realitzar una corba de tolerància a la glucosa i una corba de resposta glucèmica a la insulina. També es van analitzar en el teixit hepàtic, muscular i adipós les proteïnes GLUT2, GLUT4 i AMPK α per la tècnica western-blot, al ser paràmetres relacionats amb la sensibilitat a la insulina.

2. SENSIBILITAT A LA INSULINA

Després de mesurar els nivells de glucosa basal als 20, 40, 60 i 120 minuts (Figura 7) s'observa que els ratolins amb la dieta HC incrementen significativament les concentracions de glucosa respecte el Control. En canvi, els ratolins que se'ls va

administrar una dieta NC després de la inducció de la RI retornen als nivells normals de glucèmia sense haver diferència significativa amb el grup Control. En l'àrea sota la corba glucèmica (Figura 7B), s'evidencia com la del grup HC és significativament major respecte els altres dos grups, concretament s'evidencia un augment del 67% respecte el grup Control i de 53% respecte el grup NC.

A l'analitzar el test de resposta glucèmica a la insulina (Figura 7C), després de la injecció d'insulina, s'observa un comportament similar entre el grup Control i el grup NC i una disminució de la resposta en el grup HC, encara que la diferència no és significativa entre els grups. Al realitzar la gràfica de l'àrea sota la corba insulínica (Figura 7D) tampoc s'observa una diferència significativa, encara que hi ha un 27% d'augment en el grup HC respecte els altres dos grups.

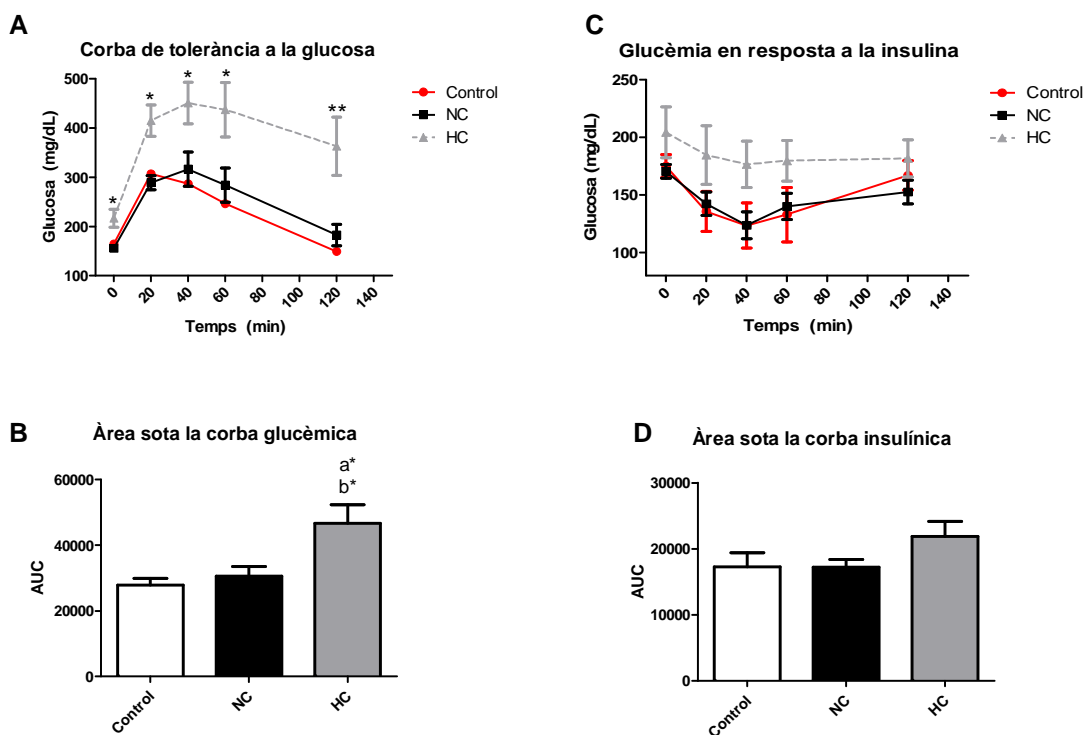


Figura 7. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Corba de tolerància a la glucosa (A) i la seva corresponent àrea sota la corba (B) i Resposta glucèmica a la insulina (C) i la seva corresponent àrea sota la corba (D). Els valors marcats de la Figura 7A mostren diferències significatives entre el Control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Els valors marcats de la Figura 7B mostren diferències significatives entre grups (* $p < 0.05$ a amb respecte Control i b amb respecte NC). En la Figura 7A i 7C es representa l'error estàndard de la mesura.

Per tant, els resultats de la prova indiquen que els ratolins amb la dieta NC reverteixen la RI induïda per una dieta hipercalòrica, ja que s'observa un patró similar al Control en la prova de tolerància a la glucosa i en la prova de sensibilitat a la insulina.

Aquests resultats van en consonància amb un estudi realitzat en ratolins on els que ingerien una dieta amb un baix contingut en greix milloraven més la RI que el grup amb una dieta alta en greix amb una restricció del 30% d'aliment ⁸¹. Podem afirmar que els ratolins reverteixen la RI gracies al canvi de dieta amb un contingut menor en greix.

Encara que la glucèmia basal (Figura 8A) en el grup HC està significativament augmentada respecte els altres grups (32% més que el grup Control i 39% més que el grup NC), i tot i els canvis en la corba de glucosa (Figura 7A), la concentració de fructosamina (Figura 8B) resta inalterada a diferència de la primera part dels resultats exposats (Model d'inducció de RI). Els resultats baixos de fructosamina poden ser a causa d'una disminució de la proteïna total en sang i/o els nivells d'albúmina associada a un dany hepàtic, encara que no s'han analitzat en aquesta tesi.

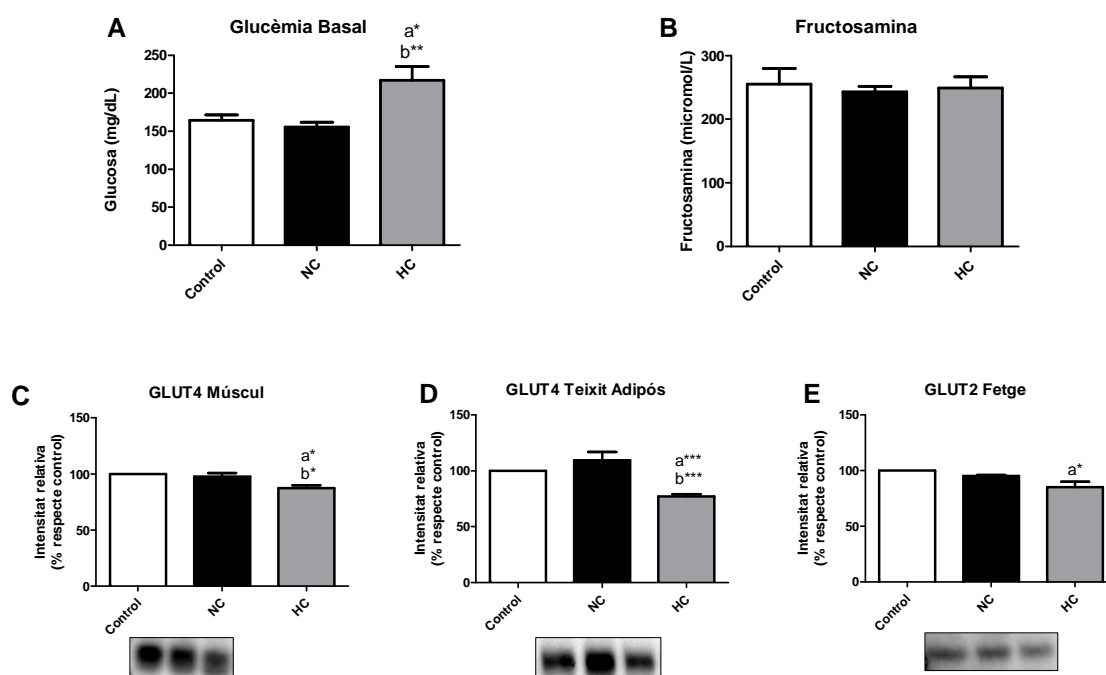


Figura 8. Control glucèmic després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Glucèmica basal (mg/dl) (A), Fructosamina (micromol/L) (B). Quantificació de GLUT4 en múscul (C) i teixit adipós (D) i de GLUT2 en fetge (E) per densitometria. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$. a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

El transport de glucosa en les cèl·lules dels mamífers es duu a terme per una família de transportadors de glucosa (GLUT) que mostren una distribució tissular diferent ⁸². La proteïna GLUT4 es troba principalment en el teixit adipós i muscular i facilita el transport de glucosa a la cèl·lula amb l'estimulació de la insulina ⁸³. S'ha estudiat que la RI causa una regulació defectuosa d'aquest transport i afecta l'absorció

de glucosa en el múscul esquelètic ⁸⁴ i que la sobreexpressió de GLUT4 en el teixit adipós dels ratolins millora la utilització de glucosa i la sensibilitat a la insulina en tot el cos ⁸⁵. En el múscul s'observa una diferència significativa en el grup HC respecte el Control i NC, ja que hi ha una disminució del 12 i del 10% respectivament (Figura 8C). En el teixit adipós (Figura 8D) s'observa en el grup NC una recuperació i fins i tot un augment respecte el Control (del 9%), en canvi en el grup HC hi ha una disminució del 23% respecte el Control. Respecte GLUT2 (Figura 8E) que s'expressa al fetge i juga un paper important en l'absorció de glucosa postprandial al fetge, s'observa com en el grup HC està significativament disminuïda respecte el Control. Aquesta disminució dels nivells dels transportadors de glucosa als tres teixits, suggereix que hi hagi un augment de la resistència a la insulina en el grup HC.

L'AMPK α controla els fluxos metabòlics en resposta a canvis en els nivells d'energia cel·lular ⁸⁶ i s'activa quan l'energia cel·lular s'esgota ⁸⁷. L'AMPK α s'activa per l'augment de la relació AMP:ATP i resulta en la repressió dels processos anabòlics que consumeixen ATP (com ara la síntesis d'àcids grassos, colesterol, glicogen i proteïnes i la gluconeogènesis) i l'activació de la producció d'ATP dels processos catabòlics (com ara l'absorció d'àcids grassos, l'oxidació i la captació de glucosa) per mantenir el magatzem d'energia cel·lular ^{88,89}. Per tant, també es relaciona amb l'homeòstasi de la glucosa l'activitat de l'enzim AMPK α , on el resultat net de la seva activació és la generació d'un medi metabòlic favorable a la prevenció de la RI (activa la translocació del GLUT4, la qual podria ser favorable a la prevenció de la RI) ⁹⁰.

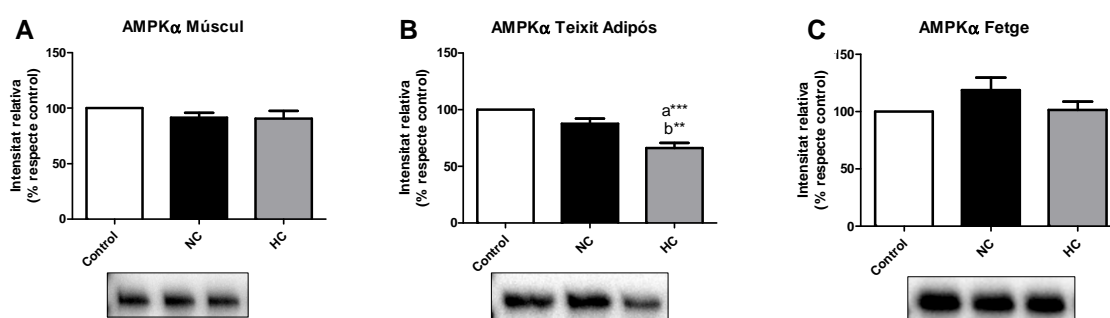


Figura 9. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació d'AMPK α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

En la Figura 9A encara que no s'observa una diferència significativa en els nivells d'AMPK α en el teixit muscular hi ha una disminució del 8% en el grup NC i del 9% en el grup HC. En canvi, en el teixit adipós (Figura 9B) si que s'observa una

disminució significativa del 34% en el grup HC, aquesta disminució es reverteix al incloure un tractament amb dieta NC als ratolins (on solament s'observa una disminució del 12% en el grup NC respecte el Control), i per tant aquests resultats anirien en relació amb els observats al mesurar GLUT4 en el teixit adipós (augment d'AMPK α i augment de GLUT4), ja que l'activació d'AMPK α contribueix a la transcripció de GLUT4⁹¹. Respecte el fetge (Figura 9C) no s'observen diferències significatives entre els grups.

És necessari ressaltar que el múscul esquelètic, que és el teixit perifèric més important en la captació de glucosa en resposta a la insulina, és un dels teixits afectats negativament per la RI. Un dels factors proposats involucrats en el deteriorament de la funció de la insulina és l'increment de la deposició de lípids al múscul esquelètic⁹². Per tant, com s'observa en la Figura 10, un excés de greix produït en condicions de sobrealimentació i que condueixen a l'obesitat, altera la funció del teixit adipós i que aquest adipòcit hipertrofiat, augmenta la secreció d'hormones insulinoresistents (resistina) i redueix les insulinosensibles (adiponectina). Per tant, hi ha un augment AGL que s'utilitzen com a font d'energia als diferents teixits competents de glucosa. Això provoca l'augment de la concentració de TG intramiocel·lulars i que condueix a la RI pertorbant les vies de senyalització d'insulina⁹³. Aleshores, amb el tractament amb una dieta normocalòrica, hi ha una normalització del GLUT4 i de l'AMPK α al teixit adipós que aquests canvis podrien induir la normalització de GLUT4 al múscul i un augment de la sensibilitat a la insulina en aquests ratolins.

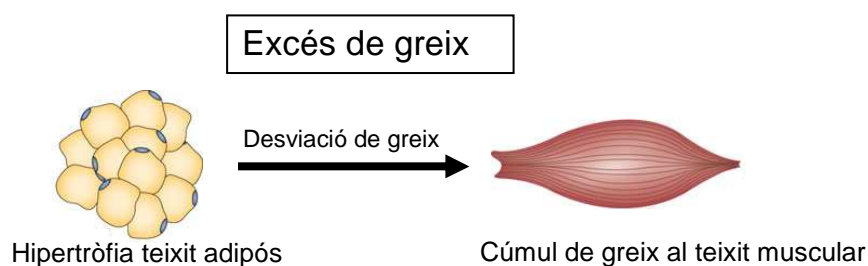


Figura 10. Conseqüència metabòlica de l'excés de greix a la dieta.

A continuació, es vol estudiar si s'observa memòria metabòlica després del tractament per canvis en la capacitat funcional del mitocondri. Per això, es van avaluar proteïnes relacionades amb la biogènesi i en la morfologia mitocondrial i en la quantitat d'ADNmt.

3. CANVIS EN L'ADNmt I PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI

Els mitocondris, com a coordinadors centrals del metabolisme energètic, estan àmpliament implicats en la SM^{94,95}. Els mitocondris es poden adaptar als canvis en la disponibilitat de substrat a través de diferents vies de senyalització i la remodelació de la seva estructura i la dinàmica com a sensor del seu control de qualitat⁹⁶. Hi ha certa discrepància en la literatura respecte la funció mitocondrial, d'una banda, si la RI s'associa amb la disfunció mitocondrial³² o d'altra banda, si la disfunció mitocondrial pot promoure la RI com un mecanisme per protegir la cèl·lula d'un excés d'energia⁹⁷. Molts científics han optat per les cèl·lules musculars per investigar el rol del mitocondri en la sensibilitat a la insulina, ja que aquests representen la part més gran de la captació de glucosa en tot el cos al requerir major quantitat d'energia per a la seva funció bioenergètica. No obstant això, el fetge i el teixit adipós juguen un paper clau en la regulació de la glucosa, i atès que el nombre i la funció mitocondrial varien en els diferents teixits i que, a més, tenen funcions metabòliques diferents, també es van analitzar. Respecte el que s'ha nombrat, un estudi recent indica la complexitat de la regulació mitocondrial amb la sensibilitat a la insulina específica del tipus de teixit⁹⁸.

A continuació es va estudiar si hi havia canvis en la capacitat funcional del mitocondri, per això, es va mesurar la quantitat d'ADNmt i es va avaluar la quantitat de proteïnes de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, així com proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial en el fetge, múscul i teixit adipós dels ratolins.

3.1. ADNmt

En la matriu mitocondrial trobem l'ADNmt que codifica només 13 polipèptids implicats en la fosforilació oxidativa. La resta de subunitats de la fosforilació oxidativa, estan codificats per l'ADN nuclear⁹⁹. Per tant, ha d'haver-hi una complexa interacció entre els genomes nuclear i mitocondrial. S'ha estudiat que l'expressió dels gens mitocondrials és proporcional al nombre de còpies d'ADNmt, canviant així d'acord amb el metabolisme cel·lular¹⁰⁰.

Al estudiar el nombre mitocondrial per l'avaluació de la relació d'ADNmt i d'ADN nuclear, s'evidencia solament una disminució significativa del nombre d'ADNmt al grup

HC induït per la dieta hipercalòrica en el fetge (Figura 11C), sent aquesta disminució del 16%. En canvi, la quantitat d'ADNmt en els altres teixits (Figura 11A i B) no va ser significativament diferent entre grups, encara que en el múscul (Figura 11A) es va observar un augment del 6% en el grup NC i del 9% en el grup HC. Aquest patró cap a l'augment, també es pot observar en el teixit adipós on, encara que la diferència no sigui significativa, el grup NC experimenta un augment del 4% i el grup HC del 20% en el nombre de mitocondris. En la literatura hi ha estudis que han observat un augment dels mitocondris al múscul en ratolins alimentats amb dietes altes en greix ³². En aquest treball indiquen que l'alimentació amb una dieta alta en greixos incrementava els àcids grassos en plasma a uns nivells que induïen a un augment de la biogènesi mitocondrial en el múscul esquelètic, tot i que aquest augment del mitocondri sembla ser un esdeveniment primerenc transitori que es perd amb la RI i amb el progrés de l'obesitat ³². Contràriament al que s'ha observat, en un estudi en rates que s'analitza el teixit adipós, s'observa una reducció del contingut mitocondrial, i que aquesta reducció tenia lloc després del desenvolupament de l'alteració de l'homeòstasi de la glucosa i que venia donat per l'augment d'àcids grassos al plasma ⁶⁴.

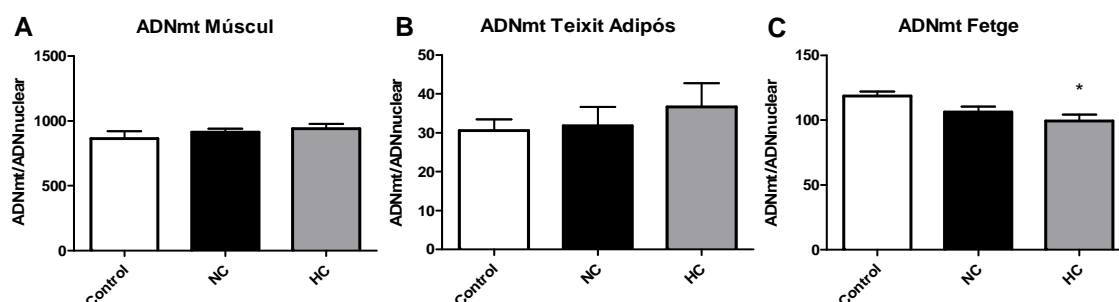


Figura 11. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Avaluació de l'ADNmt en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. La quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant el marcador Cytb i es normalitza i es determina segons l'amplificació del gen *Actb* utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta C_t}$). El valor marcat mostra una diferència significativa respecte el control ($p < 0.05$).

També és important assenyalar que el nombre de mitocondris varia considerablement entre teixits, per tant, es pot observar una major quantitat d'ADNmt en el múscul i unes 30 i 10 vegades menys en el teixit adipós i en el fetge respectivament en comparació amb el múscul. Aquestes diferències en el contingut de mitocondris ens suggeriria que probablement petits canvis en la quantitat de mitocondris al múscul tindrien una gran rellevància. O que grans canvis en la quantitat en el teixit adipós no tindrien la mateixa repercussió respecte el teixit muscular.

3.2. PORINA

Les porines són unes proteïnes que es troben a la membrana externa del mitocondri i formen uns canals aquosos a través de la bicapa lipídica sent així altament permeables a molècules. Per tant, controlen l'entrada i sortida de diferents metabòlits, principalment ATP/ADP, NADH i anions fosfat. A més s'ha suggerit que la porina és un regulador dinàmic de la funció mitocondrial global i que pot bloquejar la permeabilitat de la membrana externa mitocondrial (per exemple si hi ha un dany mitocondrial) per la seva supressió ¹⁰¹.

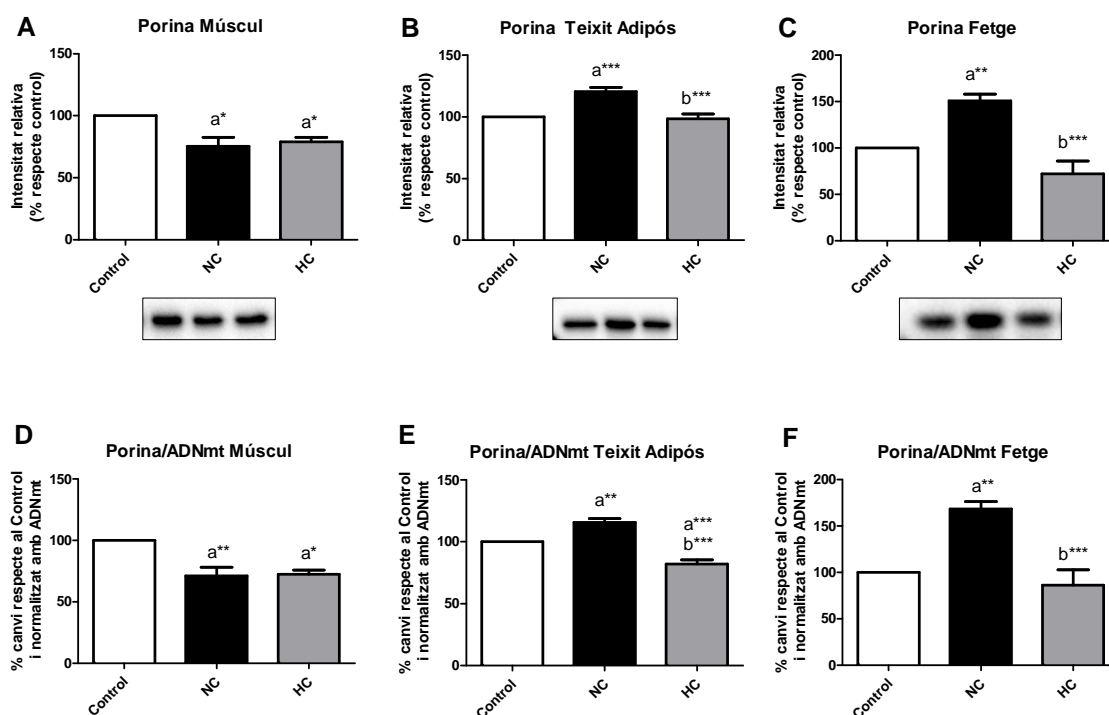


Figura 12. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de la porina per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B), i fetge (C) i normalitzada amb l'ADNmt en múscul (D), teixit adipós (E) i fetge (F). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

En la Figura 12 s'observa que en el múscul hi ha una disminució significativa de la porina en els grups NC i HC respecte el Control. En canvi, en el teixit adipós i en el fetge s'observa un augment significatiu del grup NC respecte el Control (20% en el teixit adipós i 50% en el fetge). En canvi, en el grup HC tot i que respecte el Control la diferència no és significativa, hi ha una disminució del 2% en el teixit adipós i del 28% en el fetge. Quan s'iguali la porina amb la relació ADNmt/ADNnuclear s'observa a més una disminució significativa en el teixit adipós del grup HC respecte el Control. Aquestes diferències entre grups i teixits en la porina es podrien relacionar amb la utilització de l'energia, ja que en el teixit adipós i en el fetge possiblement hi ha un

increment en la permeabilitat a NADH i FADH que pot suggerir un augment de la despesa energètica com es relaciona amb la ingesta de dieta (hi ha una disminució en el grup NC d'ingesta calòrica). Suggestint en el grup NC la possibilitat de l'ús de l'energia emmagatzemada del teixit adipós, i podent estar la despesa energètica compensada entre la ingesta dietètica i les reserves energètiques.

3.3. CANVIS EN ELS COMPLEXOS MITOCONDRIALS

Durant el cicle de Krebs es produeix i s'emmagatzema energia en forma de NADH i FADH₂. Aquests electrons passen per la cadena de transport d'electrons on es forma ATP. La cadena de transport d'electrons es troba a la membrana interna del mitocondri, i la producció d'ATP depèn de l'oxidació de NADH i FADH₂ o la fosforilació de l'ADP, mentre que l'ATP sintasa produeix ATP a través del gradient de protons. La cadena respiratòria està constituïda per 4 complexos enzimàtics que contenen diferents subunitats, que són codificades de forma simultània en els genomes mitocondrials i nuclears ¹⁰². El complex I o NADH deshidrogenasa, el complex II o succinat deshidrogenasa (ambdós cedeixen electrons a la coenzima Q o ubiquinona), el complex III o citocrom bc₁ (que cedeix electrons al citocrom c) i el complex IV o citocrom c oxidasa (cedeix electrons al O₂ per produir dos molècules d'aigua). Per tant, les activitats dels complexos mitocondrials estan estretament relacionats amb la funció mitocondrial de consum d'oxigen i la producció d'ATP. En aquest escenari, un estudi recent documenta que la ingestió d'una dieta hipergrassa sembla que canvia les quantitats de diverses proteïnes que pertanyen a la cadena respiratòria mitocondrial, ja que aquests ratolins van mostrar significativament un major estat 3 de la respiració (amb un substrat a base de lípids) ¹⁰³.

A continuació s'han quantificat els complexos mitocondrials i després aquests s'han normalitzat respecte l'ADNmt per poder valorar la quantitat de complexos respecte el nombre de mitocondris. Així, aquestes dues mesures donarien una idea de si les diferències entre grups en els complexos són a causa de canvis en el metabolisme o per canvis en la morfologia mitocondrial.

3.3.1. Complexos mitocondrials en el múscul

En els complexos mitocondrials analitzats en el teixit muscular (Figura 13), es pot observar en el complex I una disminució significativa del 32% en el grup HC respecte

el Control i del 25% respecte el grup NC (Figura 13A). Al normalitzar el complex I amb l'ADNmt aquesta diferència entre els grups augmenta, havent una disminució del 38% respecte el Control i del 28% respecte el grup NC (Figura 13E).

Respecte el complex II (Figura 13B) no s'observen diferències significatives tot i que hi ha una disminució del 5% dels valors en el grup NC i del 7% en el grup HC respecte el Control. Quan es normalitza per l'ADNmt (Figura 13F) la diferència augmenta un 10% en el grup NC i un 15% en el grup HC, sent aquesta diferència significativa en el grup HC.

En el complex III (Figura 13C) no s'observen diferències significatives tot i que hi ha un augment del 16% en el grup NC respecte el grup Control i de 15% respecte el grup HC. Al normalitzar amb l'ADNmt (Figura 13G) la diferència entre el grup NC i HC es pronuncia més havent una diferència significativa entre aquests dos grups (18% d'augment).

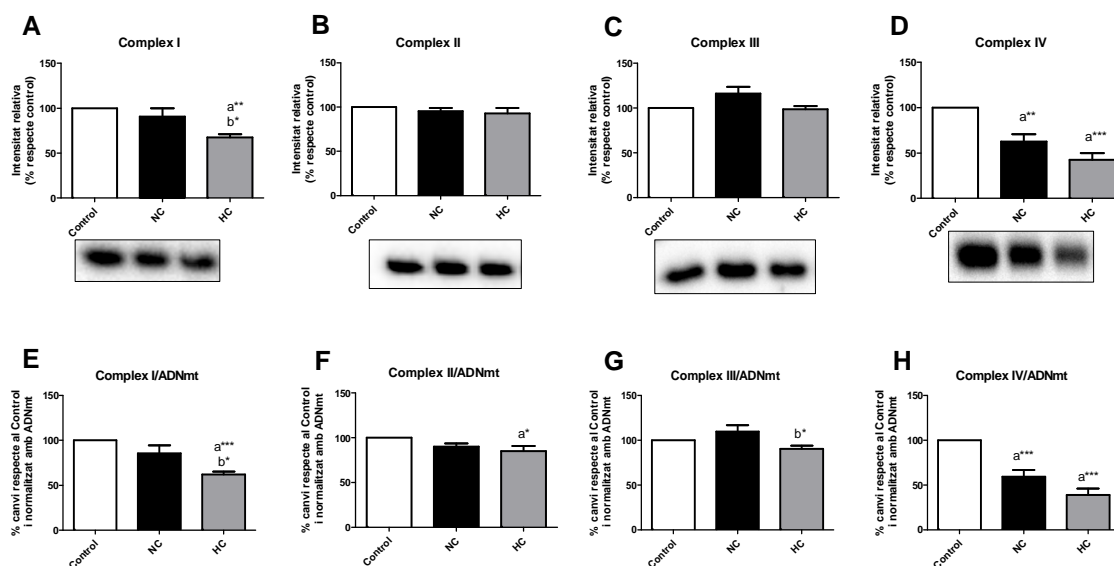


Figura 13. Complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit muscular (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

Finalment en el complex IV (Figura 13D) és on s'observa més diferències entre els grups. Hi ha una disminució del 37% en el grup NC i del 54% en el grup HC respecte el Control. Aquestes diferències augmenten de significança quan es normalitzen respecte l'ADNmt (Figura 13H), on s'observa una disminució del 41% en el

grup NC i de 61% en el grup HC respecte el Control. Per tant, en el complex IV hi ha una recuperació gradual quan es canvia de la dieta hipercalòrica a normocalòrica.

Concloure que, en el múscul existeix en el grup HC una disminució de tots els complexos mitocondrials en relació amb l'ADNmt que es tendeix a revertir amb la dieta NC. Ja s'ha descrit anteriorment una disminució significativa de l'activitat del complex I al múscul esquelètic en pacients amb obesitat i DM2 a causa d'una afectació de la morfologia del mitocondri ⁴⁷. Per tant, es pot observar com el grup NC recupera primer els complexos I, II i III. Respecte el complex IV tot i que està disminuït respecte el Control en el grup NC s'observa una recuperació gradual i es podria relacionar amb un estudi on l'augment del complex IV en el múscul esquelètic de ratolins contribueix a una major capacitat respiratòria mitocondrial ¹⁰⁴.

3.3.2. Complexos mitocondrials en el teixit adipós

Respecte al teixit adipós, en el complex I (Figura 14A) no s'observen diferències significatives tot i que hi ha un augment del 11% en el grup HC respecte el Control, però quan es normalitza amb l'ADNmt (Figura 14E) aquesta diferència disminueix sent el valor un 7% menor que el grup Control.

En el complex II (Figura 14B) hi ha una disminució significativa dels grups NC (21%) i HC (27%) respecte el Control, aquesta disminució augmenta quan es normalitza amb l'ADNmt (27% NC i 41% HC) i a més també augmenta significativament la diferència entre el grup NC i HC, sent d'un 19% menys en el grup HC respecte NC.

Respecte el complex III (Figura 14C) s'observa una disminució del 10% en el grup NC i una disminució significativa del 32% en el grup HC respecte el Control i del 24% respecte el grup NC. Quan es normalitza amb l'ADNmt (Figura 14G) hi ha una disminució del 14% en el grup NC i del 43% en el grup HC respecte el Control. La disminució en el grup HC respecte NC és del 34%. Per tant, hi ha una recuperació en el complex III en el grup NC.

Per últim, en el complex IV (Figura 14D) hi ha una disminució en el grup HC respecte el Control (22%) i el grup NC (25%). Quan es normalitza amb l'ADNmt (Figura 14H) s'observa una disminució del 35% en el grup HC respecte els grups Control i NC.

De forma similar en el múscul, en el teixit adipós s'observa una disminució en el contingut de complexos/ADNmt exceptuant el complex I, el qual no es veu afectat pel tractament amb una dieta hipercalòrica. Per un altre costat, en aquest teixit, a diferència del múscul, s'observa una recuperació total del complex IV. Respecte la disminució en els complexos mitocondrials en el grup amb una dieta hipercalòrica, en un estudi s'ha observat una disminució de les proteïnes mitocondrials en el teixit adipós de rates amb RI⁶⁴.

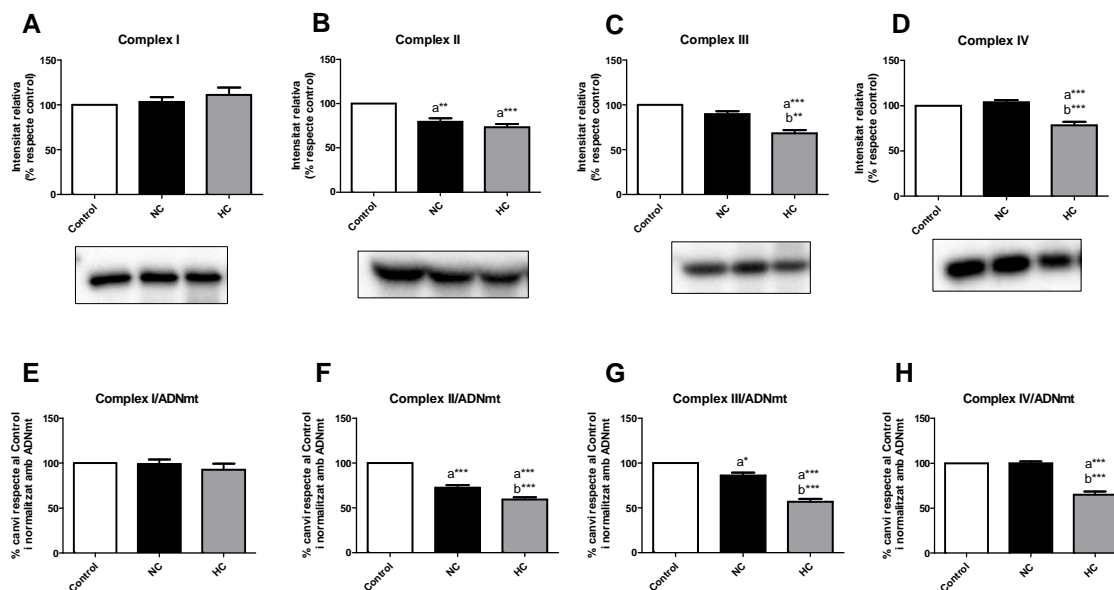


Figura 14. Complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit adipós (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

3.3.3. Complexos mitocondrials en el fetge

En el complex I (Figura 15A) encara que les diferències no siguin significatives s'observa un increment del 20% en el grup NC respecte el Control i una disminució del 24% en el grup HC respecte el Control. Quan es normalitza amb l'ADNmt (Figura 15E) l'augment en el grup NC és del 35% tot i que la diferència no és significativa.

En el complex II (Figura 15B) tampoc s'observa una diferència significativa entre els grups tot i la tendència cap a l'augment en el grup NC (un 16% més respecte el Control i el grup HC). No obstant això, al normalitzar el complex II amb l'ADNmt (Figura 15F), s'observa un augment significatiu en els grups NC (30%) i del grup HC (21%).

El complex III (Figura 15C) també segueix el mateix patró que els altres complexos. Hi ha un augment en el grup NC del 43% respecte el Control i del 18% respecte HC (HC 17% més que el Control). Quan es normalitza amb l'ADNmt (Figura 15G) l'augment és del 59% en el grup NC respecte el Control i de 39% en el grup HC respecte el Control.

Finalment, el complex IV (Figura 15D) segueix el mateix comportament que els altres complexos, sent aquí les diferències significatives. Es pot observar un augment en el grup NC del 39% respecte el Control i del 48% respecte el grup HC. Segueix el mateix patró de diferència quan s'igualen els resultats del complex IV respecte l'ADNmt (Figura 15H).

A diferència dels altres teixits, en el fetge no hi ha canvis amb la RI, encara que amb el tractament amb dieta normocalòrica s'observa un increment en el nombre de complexos. Aquest increment es podria atribuir a l'augment d'energia a metabolitzar en els ratolins del grup NC i relacionat també amb l'augment de la porina que es relacionaria amb l'augment d'entrada d'energia al mitocondri.

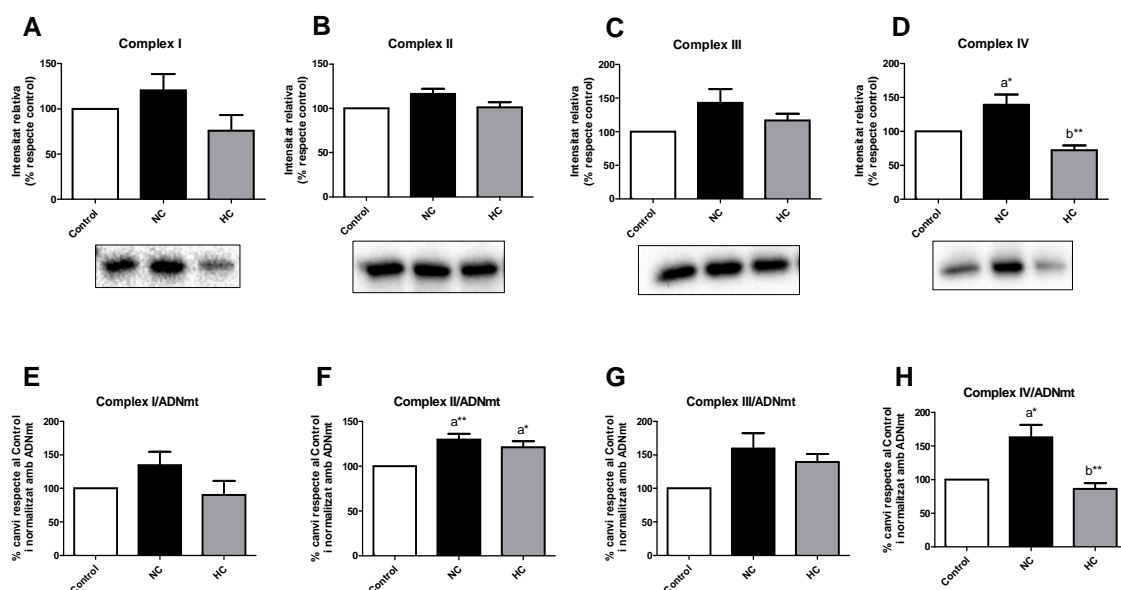


Figura 15. Complexos mitocondrials en el fetge després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit hepàtic (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H) Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $p < 0.01$. a amb respecte a Control, b comparant NC i HC)

Com s'ha pogut comprovar fins ara, els canvis en la ingesta energètica s'han vist reflectits en l'ADNmt, els complexos mitocondrials i la porina. A continuació es vol observar si aquests canvis estan relacionats amb les vies de senyalització SIRT1,

PGC-1 α i MFN2 que juguen un paper important en la regulació del metabolisme i la biogènesi mitocondrial.

El PGC-1 α regula la biogènesi i la remodelació mitocondrial ¹⁰⁵, en aquest sentit, els nivells d'expressió de PGC-1 α poden estar directament relacionats amb l'activitat de biogènesi mitocondrial. L'activitat de PGC-1 α no és constant i es pot ajustar en resposta a diferents situacions metabòliques. S'han descrit dos sensors metabòlics com l'AMPK i SIRT1 que afecten directament a l'activitat de PGC-1 α a través de la fosforilació i la deacetilació respectivament (Figura 16). En relació amb això, AMPK α , SIRT1 i PGC-1 α podrien actuar com una xarxa per millorar la condició metabòlica.

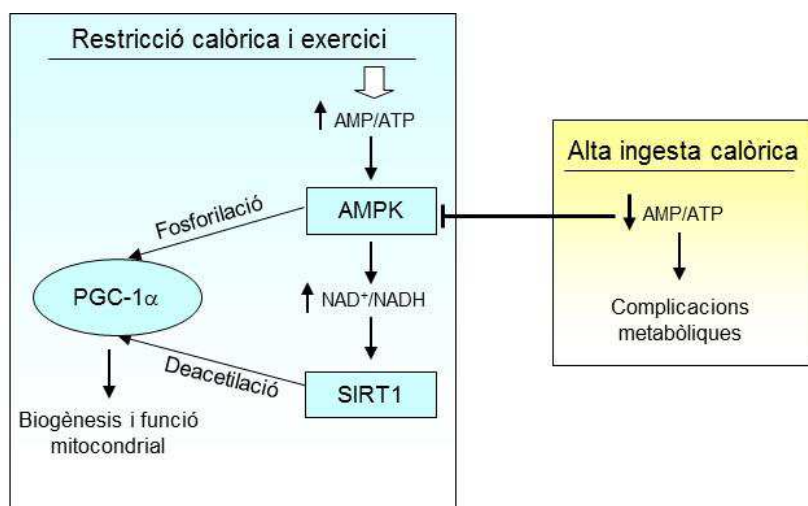


Figura 16. Mecanismes pels quals AMPK i SIRT1 s'activen i milloren l'activació de PGC-1 α que al seu torn estimula la biogènesi i la funció mitocondrial.

Les situacions d'esgotament de l'energia són detectades pels enzims AMPK i SIRT1 que milloren l'activació de PGC-1 α . En situacions amb una alta ingesta calòrica, l'activitat de l'AMPK α es tanca pels alts nivells d'ATP intracel·lulars i per tant les pertorbacions en aquesta xarxa metabòlica poden contribuir a les complicacions metabòliques de tot el cos.

En aquest apartat es veu oportú tornar a mencionar la Figura 9 dels resultats de l'AMPK α on s'observa un increment en el grup NC respecte HC en el teixit adipós i en el fetge (en aquest cas l'augment no és significatiu). L'AMPK és una kinasa que s'activa en les situacions de dèficit energètic quan el balanç AMP/ATP s'incrementa ¹⁰⁶. De la mateixa manera, NAD⁺/NADH és un mediador de la via de SIRT1/PGC-1 α ¹⁰⁷. En ambdós casos, la seva activació tendeix a induir biogènesi mitocondrial i/o modificacions en la funció mitocondrial.

En primer lloc, respecte l'AMPK α , ja s'ha descrit que la seva activació actua com un interruptor de la biogènesi mitocondrial ¹⁰⁶, ja que els nivells d'AMPK α

augmenten l'expressió de PGC-1 α ¹⁰⁸ i per consegüent poden augmentar la biogènesi mitocondrial en el múscul esquelètic ¹⁰⁹. També s'ha estudiat que l'activació d'AMPK α als adipòcits resulta en un increment de la biogènesi mitocondrial i del catabolisme lipídic ^{110,111}. Per un altre costat, SIRT1 és un enzim que intervé en la deacetilació de NAD⁺ que modula l'expressió de gens en teixits metabòlicament actius en resposta a la manca de nutrients com ara múscul ¹¹², fetge ^{113,114} i teixit adipós blanc ¹¹⁵. S'ha descrit que pot deacetilar PGC-1 α i per tant augmentar la seva activitat ¹¹⁶ i també que millora la sensibilitat a la insulina ¹¹⁷, que podria ser mediat principalment a través d'una reducció de la producció de glucosa des del fetge (en condicions d'alt contingut calòric, SIRT1 pot bloquejar la gluconeogènesis hepàtica mitjançant la modulació de PGC-1 α ¹¹⁴).

3.4. SIRT1

En la Figura 17 es mostren els resultats de SIRT1. En general s'observa una disminució de SIRT1 en situacions de dieta hipercalòrica tant en el múscul com en el teixit adipós, havent en aquest últim teixit una reversió amb el tractament amb dieta normocalòrica. Concretament, respecte el múscul hi ha una disminució significativa en els grups NC (21,7%) i HC (26,2%) de SIRT1 respecte el Control. En el teixit adipós solament s'observa una diferència significativa en el grup HC respecte el Control (17,1% de disminució). En canvi en el fetge, no s'observen diferències significatives entre grups tot i que hi ha una disminució del 30,3% en el grup NC i del 26,2% en el grup HC. Aquests valors en el fetge podrien anar en relació amb un estudi on la restricció calòrica s'associa amb una disminució de la proteïna SIRT1 al fetge i que s'ha observat que aquesta restricció disminueix la relació NAD⁺/NADH ¹¹⁸.

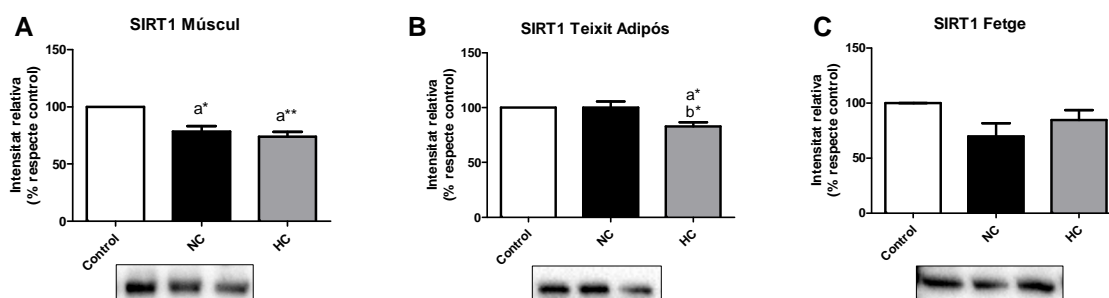


Figura 17. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de SIRT1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferència significatives entre els grups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). a amb respecte Control, b comparant NC i HC).

3.5. PGC-1 α

En situació de RI, s'observa una disminució en els nivells de PGC-1 α al múscul i al fetge. Aquesta disminució és revertida per l'adequació energètica al fetge. En la Figura 18 es descriu amb més detall els nivells de PGC-1 α on s'observa una disminució significativa dels dos grups amb intervenció dietètica en el teixit muscular, sent aquesta disminució del 27% en el grup NC i del 38% en el grup HC. En el teixit adipós s'observa una disminució del 33% en el grup NC respecte el Control i del 17% en el grup HC, sent la diferència entre el Control i el grup NC significativa. En canvi en el fetge no s'observa una diferència significativa entre el grup Control i NC, però sí una disminució significativa en el grup HC respecte el Control (22%) i el grup NC (16%).

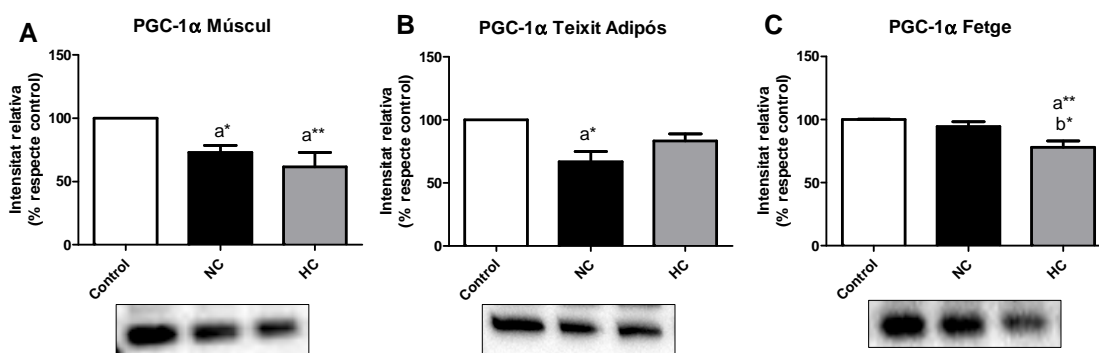


Figura 18. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de PGC-1 α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferència significativa entre els grups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ a amb respecte Control, b comparant NC i HC).

No obstant l'evidència descrita anteriorment, en els resultats no s'observa una relació directa entre els nivells d'AMPK α i els nivells de PGC-1 α als tres teixits analitzats. Respecte SIRT1 aquests resultats anirien en relació amb els observats en el teixit muscular on hi ha una disminució en els grups NC i HC. S'ha estudiat que l'activació de la senyalització de SIRT1 al fetge, en contrast amb el múscul esquelètic, no augmenta la biogènesi mitocondrial ¹¹³ i per tant, probablement podria explicar que no es relacionin aquests resultats en el fetge amb els resultats de PGC-1 α en aquest teixit.

Encara que no s'observa una disminució en l'ADNmt al múscul i teixit adipós, hi ha en general una disminució dels complexos mitocondrials en els dos teixits. No obstant, encara que en el fetge hi ha una disminució de l'ADNmt en el grup HC no s'observen canvis en els complexos mitocondrials (a excepció d'una disminució del complex IV) o fins i tot hi ha augments en el grup NC, per tant, sembla que el fetge

s'adapta als canvis d'augment d'energia amb una disminució dels complexos sense afectar a les proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial.

També es podria relacionar la disminució dels complexos mitocondrials amb la disminució de PGC-1 α , ja que com s'ha reportat anteriorment els ratolins deficients amb PGC-1 α en el múscul esquelètic, reduïen notablement els nivells dels enzims mitocondrials, però sense una alteració en la sensibilitat a la insulina i la tolerància a la glucosa¹¹⁹ com podria ser en el cas del grup NC.

2.6. MFN2

Com que està reconegut que la capacitat funcional del mitocondri està estretament relacionada amb la seva organització estructural, també es va analitzar la MFN2 (Figura 19) per examinar els canvis produïts en quan a la fusió mitocondrial. S'ha estudiat que l'expressió de MFN2 és crucial per al manteniment de la morfologia, el funcionament de la xarxa mitocondrial i en el metabolisme mitocondrial i que la reducció de l'expressió de MFN2 pot explicar algunes de les alteracions associades amb l'obesitat¹²⁰. Per tant, aquestes dades impliquen un paper important de MFN2 en el metabolisme energètic mitocondrial, que en ser desregulat pot ser un factor de risc clau en la RI.

En les gràfiques següents s'observa una disminució significativa de la proteïna MFN2 en els grups NC (18%) i HC (23%) en el teixit muscular. En el teixit adipós hi ha una disminució significativa en el grup HC respecte el Control (21,3%) i NC (15,5%). En canvi, en el fetge s'observa un augment significatiu del grup NC respecte el grup Control i el grup HC.

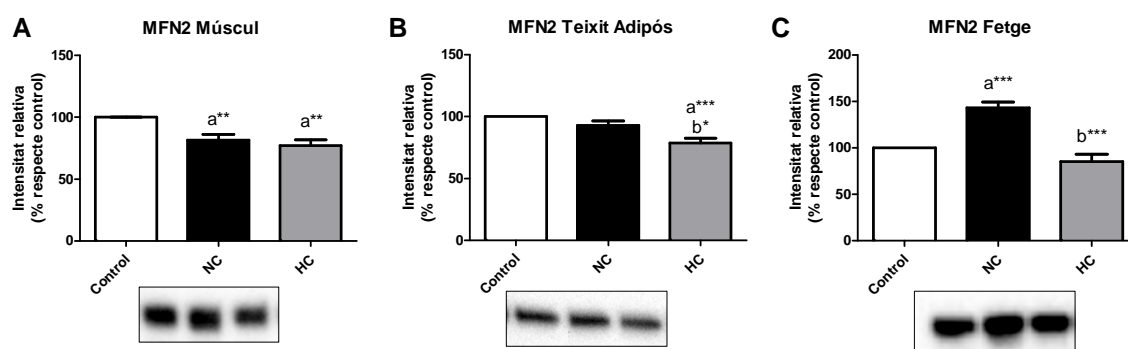


Figura 19. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de MFN2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

Els resultats de MFN2 en el múscul anirien en relació amb els resultats obtinguts en el PGC-1 α . A més, ja s'ha observat anteriorment que MFN2 es redueix en el múscul esquelètic de rates obeses Zucker (un 40%) i de subjectes obesos (reducció de l'expressió d'un 26%)^{120,121} i també s'ha observat una reducció de la massa mitocondrial causada per un augment de la fragmentació dels mitocondris¹²². L'expressió de MFN2 en el múscul esquelètic humà és directament proporcional a la sensibilitat a la insulina i és inversament proporcional al IMC, TNF α i interleukin-6¹²³, encara que en relació amb els nostres resultats, tot i que els ratolins NC augmenten la sensibilitat a la insulina, es continua observant una disminució de MFN2, però aquesta disminució passa de ser del 25% en el grup HC al 21% en el grup NC. Un estudi indica que la supressió parcial de l'expressió de MFN2 modifica el metabolisme mitocondrial en les cèl·lules, postulant que MFN2 ajuda a mantenir l'activitat màxima de certs components de la cadena respiratòria¹²⁰. Per tant, els canvis en l'expressió de MFN2 poden desestabilitzar alguns complexos i/o reduir la seva activitat com seria en el cas dels complexos en el grup HC i del complex IV en el cas del grup NC. En aquest sentit, el que s'observa en base a la reducció de PGC-1 α i MFN2 i la no reducció de l'ADNmt podria suggerir que els mitocondris siguin més petits, tot i que seria necessari un estudi de microscòpia electrònica per confirmar aquesta suposició. Ja s'ha reportat anteriorment uns mitocondris més petits en el múscul esquelètic de subjectes obesos⁴⁷.

Sembla ser que la ingesta d'una dieta hipercalòrica produeix canvis en diverses proteïnes que pertanyen a la cadena respiratòria mitocondrial i a la biogènesi mitocondrial. Seguidament, es resumiran els resultats observats de l'anàlisi de l'ADNmt i de les proteïnes relacionades amb el mitocondri.

En el teixit muscular, tot i l'augment de la sensibilitat a la insulina, el complex IV, SIRT1, PGC-1 α i MFN2 continuen amb la mateixa disminució que el grup HC. Per tant, aquesta no modificació podria ser per raó de la memòria metabòlica.

En el teixit adipós, hi ha una recuperació gradual dels complexos II i III i a diferència del teixit muscular una recuperació total del complex IV. Respecte la porina hi ha una recuperació i fins i tot un increment respecte el Control. En SIRT1 i MFN2 també hi ha una recuperació. En aquest sentit, en el teixit adipós hi ha una recuperació mitocondrial en el grup NC i es podria suggerir que la memòria metabòlica de la situació de RI s'ha perdut i que possiblement sigui la causa de l'augment de la sensibilitat a la insulina.

En el fetge, s'observa en general una normalització en PGC-1 α i fins i tot un augment de les proteïnes mitocondrials (complexos, porina, MFN2). Per consegüent, es podria suggerir que el fetge té una major capacitat d'adaptació al metabolisme energètic en comparació al múscul i teixit adipós.

En la Figura 20 s'observen els canvis produïts amb una dieta hipercalòrica i els canvis observats després del tractament amb una dieta normocalòrica. Aquests resultats indiquen que en el múscul, podria haver-hi memòria metabòlica ja que tot i la reversió de la RI i la recuperació del GLUT4, s'hipotetiza que hi ha un consum de greix en el múscul amb la consegüent captació energètica. Respecte al teixit adipós s'hipotetiza que els canvis observats són per una normalització del teixit adipós respecte el Control i per un augment de la captació d'energia. En el fetge, s'observa que els canvis produïts per una dieta HC són revertits amb la dieta NC, recuperant-se les modificacions i per tant, el fetge té una bona adaptació als canvis.

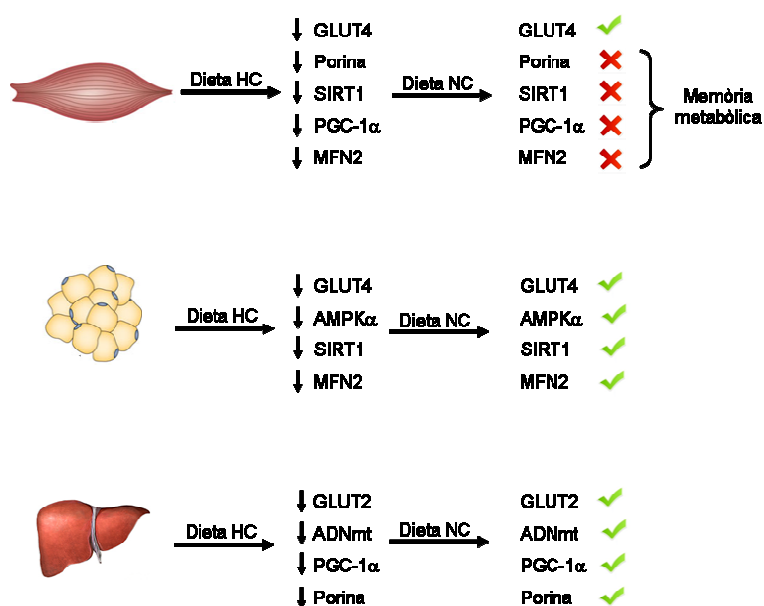


Figura 20. Canvis produïts amb una dieta hipercalòrica (HC) i els efectes d'una dieta normocalòrica (NC).

S'observa com les modificacions de la quantitat de proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial amb una dieta hipercalòrica es reverteixen en el teixit adipós i en el fetge. No obstant, aquests efectes no s'observen en el múscul, suggerint que podria haver-hi memòria metabòlica.

3.7. BCL2

Els mitocondris estan íntimament implicats en la regulació de l'apoptosi, o mort cel·lular programada ¹²⁴ i a més, controlen l'apoptosi intrínseca a través de la transició

de la permeabilitat mitocondrial regulada per l'obertura de porus i l'alliberament del citocrom c¹²⁵. La RI no indueix canvis en la quantitat de BCL2 en cap dels tres teixits (Figura 21). No obstant, en el teixit muscular hi ha un augment significatiu en el grup NC respecte el Control i el grup HC. En els altres teixits no s'observen diferències significatives entre grups, tot i que en el fetge hi ha una tendència cap a l'augment en el grup NC.

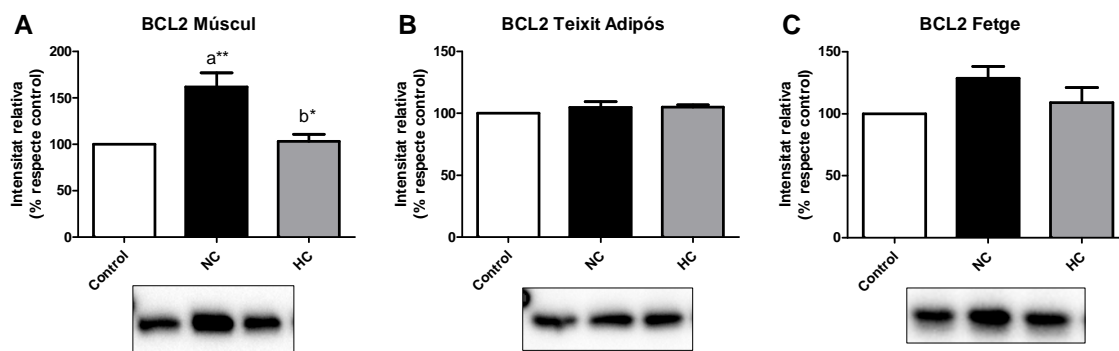


Figura 21. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de BCL2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ^a $p < 0.01$ ^b amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

4. DANY OXIDATIU

L'estrès oxidatiu bàsicament defineix una condició en la qual s'altera l'equilibri prooxidant-antioxidant en la cèl·lula, augmentant el nivell prooxidant¹²⁶ i que pot afectar a diverses biomolècules indispensables com ara les proteïnes¹²⁷. Així mateix, la pèrdua de la funció i la integritat estructural de les proteïnes pot ser causa de disfuncions cel·lulars i dany tissular. I per tant, com han suggerit diverses línies d'evidència, l'estrès oxidatiu pot ser un factor principal en el desenvolupament de la SM. Per exemple, els diabètics mostren alts nivells de dany oxidatiu sistèmic pel que fa a aquells amb el metabolisme normal de la glucosa^{128,129}.

És un fet ben demostrat que els mitocondris juguen un paper principal en la formació de radicals lliures¹³⁰, i per tant, l'estrès oxidatiu pot induir disfunció mitocondrial o viceversa i s'ha reconegut estar estretament relacionat amb la SM³³. Encara que un nivell fisiològic de ROS és important per mantenir diverses funcions de les cèl·lules, una sobrecàrrega de ROS que excedeixi la capacitat del sistema antioxidant pot induir l'estrès oxidatiu¹³¹ i per tant produir un dany en les proteïnes i en el funcionament general cel·lular. Encara que es pugui observar dany oxidatiu en

diferents estructures cel·lulars, en aquesta tesi es presenten dades de dany oxidatiu proteic, per tenir un major grau de relació amb la funcionalitat cel·lular.

4.1. DANY OXIDATIU PROTEIC DIRECTE

S'ha utilitzat el marcador semialdehid glutàmic (SAG), per mesurar el dany oxidatiu produït directament a les proteïnes. És un marcador d'oxidació directa del aminoàcid prolina i és una eina útil per avaluar l'oxidació de les proteïnes en les complicacions de la diabetis ^{132,133}. En la Figura 22, s'observa un augment significatiu d'aquest marcador en els grups NC i HC al teixit muscular. En canvi, en el teixit adipós s'observa una disminució en el grup HC i en el fetge s'observa una disminució en els grups NC i HC. Per tant, l'augment d'aquest marcador en el múscul seria normal a causa de la RI patida en aquests grups. Però contràriament al que s'esperaria, en el fetge i teixit adipós disminueix. Les diferències entre els teixits es podria atribuir a una major font d'energia en el múscul que augmenti la producció de radicals lliures així com una disminució de les defenses antioxidants. Per un altre costat, una de les accions de la insulina a més del metabolisme energètic és el control de la supervivència cel·lular. Està descrit que la insulina disminueix el catabolisme proteic (supressió de les vies de degradació de proteïnes i la regulació de les vies anabòliques) en conseqüència, en situacions de RI pot existir un increment de la degradació proteica ¹³⁴; la qual pot explicar que hi hagi una disminució de les proteïnes oxidades, sent l'efecte com s'observen en les figures diferent en relació al teixit.

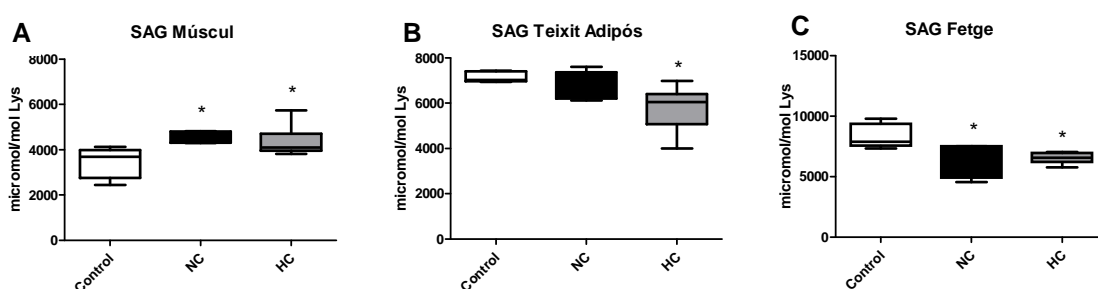


Figura 22. Nivells de semialdehid glutàmic (SAG) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Nivells de SAG (micromol/mol de Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives respecte el Control ($p < 0.05$).

4.2. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICOXIDACIÓ

S'ha utilitzat el marcador N^ε-(Carboxietil)lisina (CEL) per mesurar el dany oxidatiu proteic derivat de glicoxidació dels glúcids. CEL és un derivat de lisina que es

forma durant la reacció entre el metilgloxal i la lisina en proteïnes. Les concentracions de CEL en les proteïnes dels teixits poden ser un marcador útil de l'estrès glicoxidatiu ¹³⁵. Tanmateix, com es mostra en la Figura 23, no s'observen diferències significatives entre grups i teixits en base a aquest marcador.

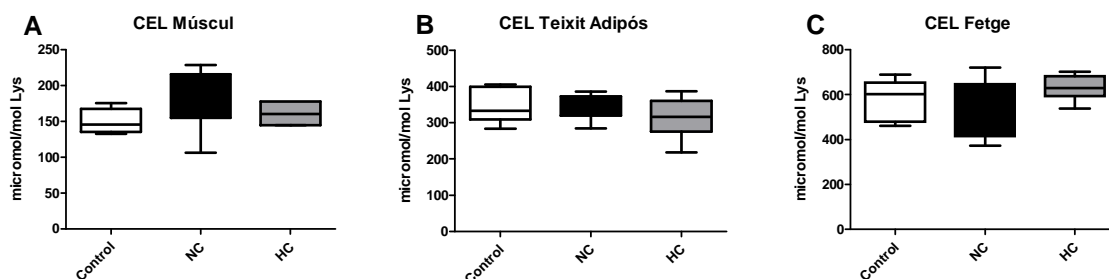


Figura 23. Nivells de Nε-(Carboxietil)lisina (CEL) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Nivells de CEL (micromol/mol de Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). No s'observen diferències significatives entre grups i teixits.

4.3. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LIPOXIDACIÓ

S'ha utilitzat el marcador malondialdehid-lisina (MDAL) per mesurar el dany proteic derivat de l'oxidació dels lípids. No s'observen diferències significatives en el teixit muscular (Figura 24A), però aquest marcador es veu significativament disminuït en el grup HC en el teixit adipós (Figura 24B) i en els grups NC i HC en el teixit hepàtic (Figura 24C). Tot i que s'ha relacionat amb un augment de MDA-proteïna en les proteïnes plasmàtiques en la diabetis, s'ha observat com en alguns teixits disminueix aquest marcador ¹³⁶ tal i com s'observa en el fetge i teixit adipós.

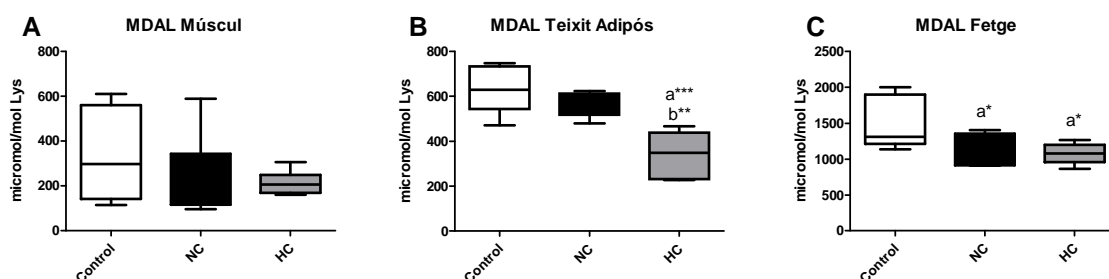


Figura 24. Nivells de malondialdehid-lisina (MDAL) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Nivells de MDAL (micromol/mol de Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

4.4. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICO I LIPOXIDACIÓ

S'ha utilitzat el marcador Nε-(carboximetil)lisina (CML) per mesurar el dany proteic derivat de glico o lipoxidació. El glixal, compost dicarbonílic, precursor de la

formació de CML, deriva de l'oxidació de carbohidrats i lípids, atès que no es pot definir el seu origen, es parla d'un compost mixt derivat de reaccions de glicolipoxidació. A causa de la funció de l'estrès glicatiu i oxidatiu en la formació de CML, els canvis en els nivells de CML en les proteïnes dels teixits s'han interpretat com una mesura de la situació d'estrès oxidatiu i de dany a les proteïnes acumulat en l'envelliment i la diabetis ¹³⁵. En la Figura 25 s'observa un augment significatiu en el teixit muscular de CML en el grup HC i encara que els ratolins hagin revertit la RI, aquest dany s'observa també en el grup NC, tot i això no hi ha diferències significatives entre grups en el fetge i teixit adipós.

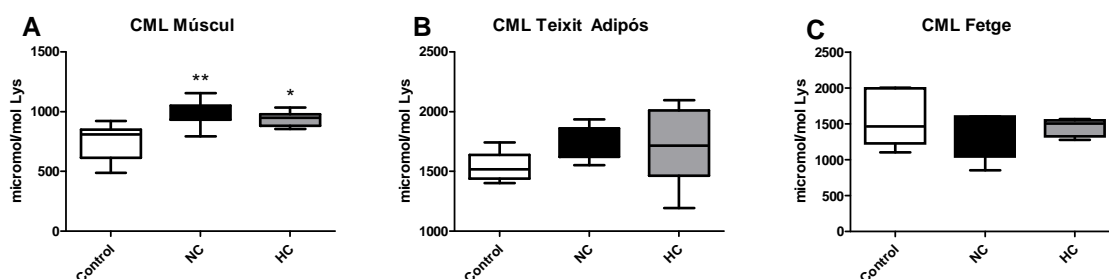


Figura 25. Nivells de N ϵ (Carboximetil)lisina (CML) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Nivells de CML (micromol/mol de Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives respecte el Control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

4.5. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LA REACCIÓ DEL FUMARAT AMB LA CISTEÏNA

S'ha utilitzat el marcador 2-Succinyl-Cysteine (2SC), format per la reacció del fumarat (intermediari del cicle de Krebs) amb residus de cisteïna de les proteïnes i aquest procés és conegut com a succinació de proteïna ¹³⁷. El 2SC pot ser un biomarcador útil de l'estrès mitocondrial a la diabetis ¹³⁸. L'excés de nutrients de la hiperglucèmia condueix a la inhibició per retroalimentació de la fosforilació oxidativa i per tant, l'acumulació intracel·lular dels compostos intermediaris mitocondrials, incloent fumarat, conduint a un augment de la succinació ¹³⁹.

En les gràfiques següents (Figura 26) no s'observen diferències significatives entre grups en els diferents teixits. Tal i com es conclou en un estudi dut a terme per Thomas et al. ¹⁴⁰, la succinació no va augmentar en els teixits muscular i hepàtic de ratolins diabètics, no obstant això, a diferència dels resultats observats en les gràfiques, ells van observar un increment de la succinació en el teixit adipós. Probablement no s'observen canvis en el teixit adipós dels ratolins que podria ser

perquè estan en estadis inicials de RI, ja que Thomas et al.¹⁴⁰ suggereixen que els majors increments en succinació depenen tant de la hiperglucèmia i com de la RI.

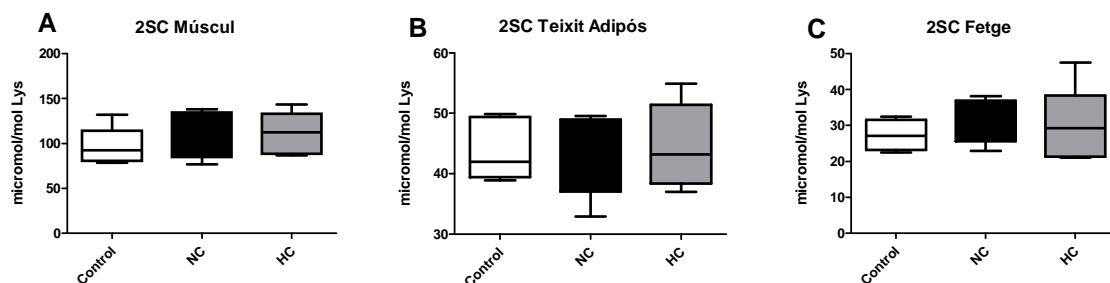


Figura 26. Nivells de 2-succinyl-cysteine (2SC) després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Nivells de 2SC (micromol/mol de Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). No s'observen diferències significatives entre grups i teixits.

Resumint els resultats dels marcadors relacionats amb el dany proteic, al múscul es pot observar un augment del dany proteic GSA i CML en els grups NC i HC. Encara que el grup NC reverteixi la RI, en el teixit muscular continua havent-hi dany a les proteïnes, possiblement a causa de la memòria metabòlica que també s'observa en les diferents proteïnes relacionades amb el mitocondri. Sembla curiós que en el fetge trobem el contrari del que succeeix en el múscul, on hi ha una disminució de GSA i MDA en els dos grups. També hi ha una disminució de GSA i MDA en el teixit adipós però solament en el grup HC. En aquest sentit, no s'ha observat en els resultats una relació directa i sistemàtica entre la reversió de la RI i els canvis en el dany oxidatiu proteic. No obstant, es podria suggerir el recanvi proteic com a possible causa de la disminució del nivell de proteïnes oxidades.

En un estudi recent¹²⁸ es resumeixen les evidències que suggereixen que la sobreproducció de superòxid induïda per la hiperglucèmia en la cadena de transport d'electrons mitocondrial desencadena una resposta mal adaptativa que afecta diverses vies metabòliques i de senyalització implicades en la fisiopatologia de la disfunció cel·lular i les complicacions d'aquesta hiperglucèmia. S'ha estudiat que les cèl·lules quan són danyades per la hiperglucèmia, no són capaces de mantenir una concentració de glucosa constant i conseqüentment hi ha un augment de la generació de ROS. Per tant, els organismes han de desenvolupar un sistema de defensa antioxidant adequat per a la protecció de les cèl·lules d'un efecte nociu de l'oxigen. Per combatre l'estrès oxidatiu, les cèl·lules han de disposar d'una maquinària antioxidant pròpia.

4.6. ENZIM ANTIOXIDANT SOD1

La superòxid dismutasa (SOD) representa la defensa cel·lular primària contra els radicals superòxid. SOD catalitza la conversió de superòxid a peròxid d'hidrogen que després es pot convertir en aigua, catalitzada tant per la glutatió peroxidasa o la catalasa ¹⁴¹. La SOD1 (CuZnSOD) es troba principalment al citoplasma, encara que també es pot trobar a l'espai intermembrana mitocondrial ¹⁴². L'augment d'expressió de SOD1 en ratolins transgènics ha demostrat que pot reduir l'estrès oxidatiu *in vivo* ¹⁴³.

En la Figura 27 s'observa una disminució significativa de la SOD1 en el grup HC en el múscul i en el teixit adipós. Contràriament, s'observa una tendència cap a l'augment en els grups NC i HC respecte el Control en el teixit hepàtic.

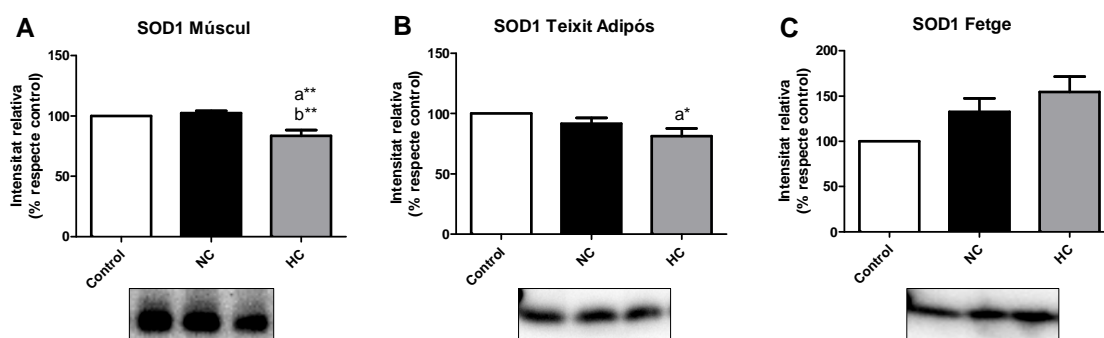


Figura 27. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica.

Quantificació de SOD1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). a amb respecte a Control, b comparant NC i HC.

S'ha demostrat que les SOD tenen un paper protector contra el dany oxidatiu en diversos teixits mitjançant la neutralització de ROS ¹⁴⁴. A més, hi ha evidència que l'obesitat està associada amb la reducció de l'expressió de diverses proteïnes antioxidants ¹⁴⁵ i per tant aquestes diferències del dany en els teixits es pot atribuir a que hi ha una disminució de la resposta antioxidant en el teixit muscular, que faria que hi hagués més dany causat per aquesta RI, i que una vegada causat el dany sigui més difícil revertir-lo encara que hi hagi una normalització de la glucèmia. Tot i l'augment del dany en el grup NC al múscul, els nivells de SOD1 estan igual que el grup Control. En el teixit adipós hi ha una disminució de la SOD1 en el grup HC encara que també hi ha una disminució del dany en aquest grup en la medició de GSA i MDA. Podria ser que aquest teixit no sigui tan susceptible al dany produït per una dieta alta en greixos o per la RI. En el fetge trobem un augment de la resposta antioxidant SOD1 i per tant es podria relacionar amb una disminució de l'oxidació proteica en els grups NC i HC. En un estudi van observar que ratolins amb sobreexpressió de SOD1 van estar protegits

d'una dieta alta en greixos que induïa intolerància a la glucosa, havent una reducció del dany oxidatiu ¹⁴⁶.

5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA

La capacitat antioxidant del plasma es va determinar per l'assaig FRAP (Figura 28A). Respecte el FRAP s'observa un augment significatiu en el grup HC respecte el Control i NC. Un estudi va evidenciar un augment significatiu de la capacitat antioxidant del plasma en pacients amb DM2 ¹⁴⁷. També s'ha mesurat l'àcid úric pel seu contingut en el plasma i que pot modificar la capacitat antioxidant d'aquest. Respecte l'àcid úric (Figura 28B) no s'observen diferències significatives entre els grups, encara que hi ha una tendència a l'augment en el grup HC. Tot i que s'ha observat una correlació entre l'augment de la capacitat antioxidant i la concentració d'àcid úric en el plasma ¹⁴⁸, no s'observen aquestes correlacions en els resultats mostrats.

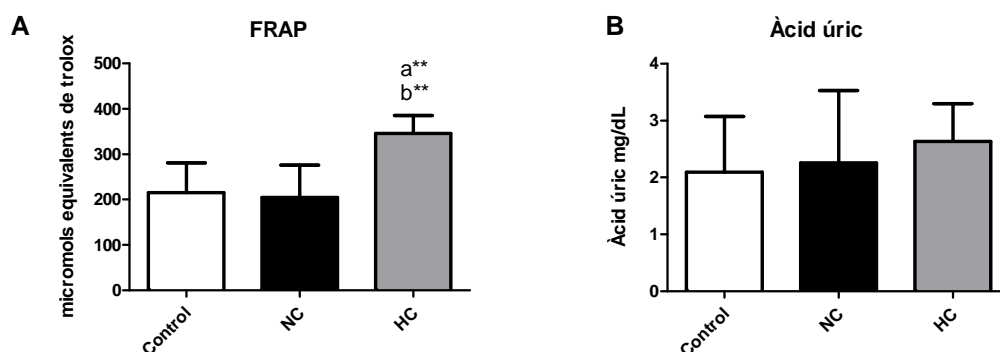


Figura 28. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb dieta normocalòrica. Capacitat antioxidant pel mètode FRAP (micromols equivalents de trolox) del plasma (A) i determinació de l'àcid úric (mg/dL) del plasma (B). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.01$. a amb respecte a Control, b comparant NC i HC).

C. DISCUSSIÓ

El ràpid augment de l'obesitat es troba vinculat amb els canvis de l'estil de vida de la població, produïts pel consum de dietes hipercalòriques, riques en greixos i sucres simples i un estil de vida sedentari ¹⁴⁹. En la primera part de l'estudi, es va establir un model experimental per poder comparar les repercussions de l'estil de vida actual en la població humana. Per a establir aquest model es va induir obesitat i RI amb una dieta hipergrassa i hipercalòrica en ratolins.

Un cop establert aquest model, es va voler estudiar si un tractament nutricional d'adequació energètica tenia capacitat de revertir els danys metabòlics produïts per la RI. Tot i això, l'evidència indica que l'exposició primerenca a la hiperglucèmia pot impulsar el desenvolupament de complicacions que es manifesten en la progressió de la malaltia i que poden persistir tot i la millora del control glucèmic, el que indica una memòria metabòlica. El concepte de memòria metabòlica es refereix a la persistència de les complicacions diabètiques després de la normalització de la glucosa.

La fisiopatologia de la RI és molt variada i molt complexa i es pot trobar un vincle molt marcat amb l'obesitat i la disminució de la despesa energètica. Així doncs, donat el paper central del mitocondri en la producció d'energia, una funció mitocondrial mal regulada a nivell cel·lular pot afectar el metabolisme de tot el cos. Per tant, en aquesta part de la tesi es va voler aclarir si l'efecte de la sensibilitat a la insulina induïda per una ingesta normocalòrica en el model animal resistent a la insulina es devia a un efecte en el mitocondri o simplement que la pèrdua de pes disminueixi aquesta resistència al influir en els canvis d'adipositat, com per exemple en un estudi amb nens obesos amb RI i amb una disminució del pes ¹⁵⁰ i en base a l'evidència de la relació entre la RI i l'obesitat ¹⁵¹. En aquest capítol s'ha comprovat que, en ratolins, el canvi de dieta hipercalòrica a normocalòrica reverteix la disminució de la sensibilitat a la insulina induïda per la dieta hipercalòrica i que aquest augment de la sensibilitat a la insulina es pot relacionar amb una disminució del pes corporal.

Encara que els teixits muscular, hepàtic i adipós són els principals teixits responsables del metabolisme de la glucosa, és raonable trobar diferències entre teixits en els diferents aspectes avaluats, això és per raó de les característiques funcionals específiques de cada teixit, així com dels seus mitocondris. El metabolisme mitocondrial està dissenyat per satisfer la demanda metabòlica i bioenergètica depenent del teixit on estiguin situats els mitocondris. Per tant, hi podem trobar canvis en el contingut mitocondrial, quantitat de complexos de la cadena de transport d'electrons, i les seves activitats intrínseques. És important assenyalar que Martin et al ⁹⁸ han estudiat que la disfunció mitocondrial en el context de RI és diferent depenent dels teixits, ja que han observat que una reducció de la fosforilació oxidativa (mitjançant la inhibició dels complexos respiratoris I i V en 3T3 adipòcits i FAO hepatòcits) va induir RI en els adipòcits, però va tenir efectes sensibilitzadors a la insulina en els hepatòcits i a més, aquests efectes es van produir de forma independent a la producció de ROS. Per tant, tot i que no s'ha mesurat la funció mitocondrial, aquest estudi podria explicar el diferent comportament del teixit hepàtic (on no hi trobem una memòria metabòlica

en el grup NC) respecte els altres dos teixits, així com podria estar relacionat amb un estudi que van observar un augment de l'expressió de la fosforilació oxidativa en el fetge de pacients amb DM2 ¹⁵².

Per exemple respecte el contingut mitocondrial que s'ha avaluat l'ADNmt i que es sap que pot patir increments o disminucions d'adaptació en resposta als canvis en la demanda d'energia i el subministrament de substrat, solament s'observa una diferència significativa entre grups en el teixit hepàtic. Possiblement juntament amb el contingut en mitocondris fa que sigui més sensible en els canvis de glucèmia, tot i que la majoria d'estudis han posat major rellevància al teixit muscular. A més el fetge s'ha considerat com un òrgan tampó per a la regulació dels fluxos metabòlics ¹⁵³ que són dependents en gran mesura dels mitocondris per generar energia a les cèl·lules. Indicar també que l'augment de les proteïnes mitocondrials en el grup NC respecte el Control i HC podria ser que la dieta amb un contingut menor de greix, faci que hi hagi un canvi en la metabolització de greixos disminuint l'oxidació d'àcids grassos i que aquesta disminució afecti a les proteïnes relacionades amb el mitocondri que s'han estudiat. En aquest sentit en un estudi s'ha observat un augment de l'expressió de la fosforilació oxidativa en el fetge de pacients amb DM2 ¹⁵².

S'ha reportat que l'alt consum de greix influeix en la disminució del contingut i funció mitocondrial ³³ i l'expressió de PGC-1 α ^{55,154}. En relació amb això s'ha observat que els ratolins després de normalitzar els nivells de glucosa continuen tenint una disminució de PGC-1 α tant en el múscul com en el teixit adipós. No obstant això, hi ha altres estudis que indiquen que l'alimentació alta en greix augmenta l'activitat dels enzims mitocondrials i que estimula la biogènesi mitocondrial, augmenta l'expressió de gens i la funció mitocondrial ^{56-58,155,156}. Respecte aquests estudis es podria relacionar la manca de diferències entre l'ADNmt en els teixits muscular i adipós.

En els ratolins del grup HC que ingereixen una dieta alta en greixos, es suposa que aquesta fa que hi hagi un augment de l'ATP i per tant una disminució de l'AMPK α com es podria observar en el teixit adipós juntament amb una disminució de GLUT4 (vist en el múscul i teixit adipós). Probablement aquests processos es relacionen amb una disminució de la MFN2 observada en els ratolins. Juntament amb l'evidència observada en la literatura en que a l'obesitat hi ha una reducció de l'expressió de MFN2 i una reducció de la mida mitocondrial causada per un augment en la fragmentació dels mitocondris ¹²⁰. En aquest sentit, tret del teixit hepàtic no s'observen

diferències en l'ADNmt i es podria suggerir que la disminució de MFN2 fa que hi hagi més fragmentació mitocondrial i no afecti a la disminució del contingut mitocondrial.

És important senyalar que l'AMPK està implicada en la regulació de PGC-1 α per fosforilació directa ¹⁵⁷. Però, tal i com indiquen Miller i Hamilton en el seu article, encara que hi hagi un increment de la transcripció de PGC-1 α , per si sol no és suficient per afirmar que hi ha un augment de biogènesi mitocondrial, ja que en un context d'estrès energètic AMPK activa PGC-1 α però simultàniament baixa la regulació de la iniciació de la traducció a través de mTOR ¹⁵⁸. En aquest sentit, probablement per això no es troba una relació entre AMPK α , PGC-1 α i l'ADNmt. Tenint en compte aquest estudi de Miller i Hamilton probablement l'augment energètic causat per la dieta alta en greixos ingerida pels ratolins activa l'AMPK α i per tant encara que hi hagi un augment de la RI, l'AMPK α no es veu afectada i aquest estrès es podria relacionar amb l'augment dels marcadors CML i GSA en el múscul dels grups NC i HC. Com s'observa en el grup NC continua havent un dany proteic igual que el grup HC, probablement el dany oxidatiu proteic produït per una dieta insulinoresistent té un efecte més marcat en el temps, produint la memòria metabòlica i per això es segueix observant aquest dany. A més, contràriament al que s'ha proposat que ROS pot intervenir en la RI a través de la funció mitocondrial, Martin et al van trobar absència de qualsevol efecte de ROS en la relació entre el deteriorament de la fosforilació oxidativa mitocondrial i la sensibilitat a la insulina i tenen en compte les conclusions oposades sobre aquest tema, destacant la complexitat de la regulació mitocondrial a les cèl·lules específiques de l'acció de la insulina ⁹⁸.

Les dades presentades poden explicar les conclusions contradictòries sobre aquest tema i posar en relleu la complexitat de la regulació mitocondrial en els tipus de teixits específics. A més, tot i que trobem mesures compensatòries en el mitocondri a causa d'un excés d'energia, alguns marcadors de dany oxidatiu no es reverteixen al normalitzar la sensibilitat a la insulina en aquests ratolins.

Respecte la memòria metabòlica, tot i que els ratolins reverteixen la RI, en el teixit adipós s'observen nivells baixos en alguns complexos, AMPK α i PGC-1 α en el grup NC i sobretot en el teixit muscular s'observen deficiències igual que el grup HC respecte el control en el complex IV, porina, SIRT1, PGC-1 α , MFN2 i en el dany oxidatiu (CML i SAG). Per tant, en aquests dos teixits existeix una memòria metabòlica ja que encara que hi haig un augment de la sensibilitat a la insulina, a nivell metabòlic

hi ha semblances amb el grup HC. A més, un dels objectius de la tesi era respondre a un dels interrogants actuals en el que no està clar si la disfunció mitocondrial és una causa o una conseqüència de la RI. En aquesta tesi i amb relació amb la memòria metabòlica, el mitocondri s'adapta als canvis produïts en la sensibilitat a la insulina. Ja que, si la disfunció mitocondrial provoca RI, en el grup NC les proteïnes relacionades amb el mitocondri haurien d'haver revertit completament la seva disminució i no és el cas en els resultats mostrats.

Per tant, sembla ser que a nivell clínic el tractament amb una dieta normocalòrica és beneficiosa per l'augment de la sensibilitat a la insulina. No obstant, els efectes observats en la RI continuen tot i el canvi en la RI, associats a una memòria metabòlica. Per tant, és necessari un estudi més a fons de les complicacions en la RI i més concretament de la memòria metabòlica. A més, respecte al que s'ha observat, crea l'expectativa d'estudiar si l'addició de compostos bioactius en el tractament de la RI modifica aquesta memòria metabòlica observada en l'adequació energètica.

V.2. Efecte del tractament amb Omega-3

A. INTRODUCCIÓ

La nutrició és un factor ambiental de gran importància en la societat actual i que està constantment en estudi per la millora i prevenció de malalties. Encara que els nostres gens d'avui en dia han sofert molt pocs canvis respecte als dels nostres avantpassats farà 40.000 anys, la nostra dieta ha patit grans canvis en els últims 10.000 anys (Eaton & Konner, 1985 cita extreta de l'article de Simopoulos ¹⁵⁹). En aquest sentit, els estudis sobre els aspectes evolutius de la dieta indiquen que els principals canvis que s'han produït són particularment en el tipus i quantitat d'àcids grassos essencials i en el contingut d'antioxidants en els aliments ¹⁶⁰. Aquesta afirmació es deu a que actualment les dietes occidentals es caracteritzen per un augment del greix total, sobretot en greixos saturats i àcids grassos omega-6 i una disminució dels àcids grassos omega-3 en comparació amb la dieta en la qual els éssers humans van evolucionar i es van establir els seus patrons genètics ^{161–163}.

Els omega-3 són àcids grassos poliinsaturats (que posseeixen més d'un doble enllaç entre els seus carbonis) de 18 o més carbonis, on el primer doble enllaç està situat entre el 3r i el 4t carboni comptant des de l'extrem metil. Engloben diversos tipus com l'àcid linolènic, l'àcid eicosapentaenoic (EPA) i l'àcid docosahexaenoic (DHA). L'àcid linolènic predomina a l'oli de lli, a les nous i als vegetals de fulla verda, el nostre cos pot transformar-lo en àcid eicosapentaenoic (EPA, 20:5 n-3) i en àcid docosahexaenoic (DHA, 22:6 n-3), encara que el procés de transformació està regulat segons la demanda. La font més eficient d'aquests àcids grassos és a través de la dieta, sent el peix blau i algunes algues la única font concentrada d'EPA i DHA ¹⁶⁴. Actualment també podem trobar omega-3 en els aliments enriquits com làctics, galetes, ous, etc.

Encara que hi ha una falta d'evidència en quant a la quantitat necessària de consum d'EPA i DHA, l'OMS recomana una ingesta mínima de 200 mg/dia, encara que s'aconsella una ingesta de 500 mg/dia per la prevenció de malalties ⁷⁰. A més, s'han descrit efectes beneficiosos de la suplementació d'omega-3, principalment EPA i DHA en la millora de la funció endotelial arterial, disminució de l'agregació plaquetària, disminució de TG circulants, la millora de la pressió arterial i la reducció de mort cardíaca després d'un infart agut de miocardi i en la progressió de la malaltia renal crònica ^{165–172}. Per tant, en termes generals és àmpliament acceptat el benefici d'un

consum d'EPA i DHA en la millora dels factors de risc de MCV, en l'alleujament de la inflamació i beneficis en la funció cerebral i la salut mental ¹⁷³.

Tot i els efectes descrits en la salut dels omega-3, els mecanismes d'acció a través dels quals es produeixen aquests efectes no estan clarament establerts. Es sap que els omega-3 s'absorbeixen principalment en les porcions distals de l'intestí prim per mitjà de transportadors específics, encara que la seva absorció i biodisponibilitat pot variar en relació amb la molècula a la qual està esterificada, la matriu alimentària i si hi ha competència entre els àcids grassos digerits. Una vegada s'han absorbit a l'intestí es poden utilitzar com a font d'energia a través de la β -oxidació o s'incorporen al reticle endoplasmàtic llis, on es duu a terme la reesterificació en molècules de TG, necessaris per la formació dels quilomicrons i el transport cap als teixits pel conducte limfàtic. Respecte a la síntesis de DHA i EPA a partir d'àcid α -linolènic es duu a terme principalment en el fetge, i s'observa una relació entre la ingesta d'àcid α -linolènic i els nivells d'EPA en els fosfolípids plasmàtics, no obstant això, no s'observa una relació entre la ingesta d'àcid α -linolènic i els nivells de DHA. La ingesta dietètica d'EPA i DHA tendeix a incrementar el seu contingut en les membranes cel·lulars a expenses d'una reducció en els nivells d'àcid araquidònic ^{174,175}.

1. OMEGA-3 I RESISTÈNCIA A LA INSULINA

En la bibliografia es poden trobar estudis epidemiològics en humans que indiquen que els omega-3 redueixen el desenvolupament de la RI, encara que hi ha un nombre limitat d'estudis d'intervenció en humans sobre els efectes dels omega-3 en la RI. En canvi, en models animals les evidències indiquen que els omega-3 poden prevenir i revertir la RI induïda per la dieta. El 1991, Storlien et al. ja van estudiar la influència de la composició del greix en la dieta en el desenvolupament de la RI en rates ¹⁷⁶, demostrant que els àcids grassos omega-3 al múscul esquelètic són importants per una senyalització eficaç de la insulina.

Així doncs, les anormalitats en la composició d'àcids grassos de les membranes musculars poden estar involucrades en la patogènesis de trastorns lligats a la RI i la hiperinsulinèmia, incloent l'obesitat, la hipertensió, la DM2, i la malaltia de l'arteria coronària, suggerint que la dieta pot influir en el seu desenvolupament ^{161,162}, més concretament la deficiència d'omega-3 contribueix entre d'altres a la RI i a la SM ^{161,176}.

Els efectes de la suplementació amb oli de peix en la RI en models animals són molt marcats, demostrant que l'omega-3 prevé el desenvolupament de l'obesitat i la RI i millora l'homeòstasi de la glucosa ^{103,177-181}. Els efectes beneficiosos que s'han observat a nivell bioquímic han estat una reducció dels nivells de TG en plasma, àcids grassos lliures, glucosa i insulina, així com una acció antiinflamatòria dels àcids grassos omega-3 ^{178,182-184}. A més, els efectes d'un tractament combinat d'omega-3 i restricció calòrica lleu és més eficaç en la protecció contra l'obesitat en ratolins ¹⁸⁵.

En humans també s'ha observat que la incorporació diària de peix en un règim de pèrdua de pes va ser més eficaç que aquestes mesures per si soles, millorant el metabolisme de la glucosa i de la insulina i la dislipidèmia ¹⁸⁶. En canvi en individus sans els omega-3 no milloren la RI on els índex ja estan dins dels intervals normals ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Tanmateix, en individus obesos, l'administració de suplementos d'oli de peix va disminuir la insulina en dejú comparat amb la pèrdua de pes per si sola ¹⁹⁰. També en un altre estudi de pèrdua de pes realitzat amb dones que tenien SM, van millorar l'àrea sota la corba de la glucosa en comparació amb aquelles dones que van mantenir el pes corporal, però la suplementació amb omega-3 no va proporcionar un avantatge afegit sobre la pèrdua de pes per si sol ¹⁹¹.

Globalment, les evidències semblen indicar que la suplementació amb oli de peix manté una adequada senyalització insulínica i disminueix el risc de la SM, suggerint que uns nivells adequats d'omega-3 a la dieta poden fer front amb els canvis metabòlics imposats per una dieta alta en greixos i sucres que és de gran importància per la salut pública. A més, l'estudi dels mecanismes en el tractament de la RI amb omega-3, permetrà generar estratègies terapèutiques per combatre aquesta patologia, ja que encara que hi ha una gran evidència que indica els efectes en la salut dels omega-3, els mecanismes d'acció no estan clarament establerts.

2. OMEGA-3 I BIOGÈNESI MITOCONDRIAL

Tot i que s'ha demostrat que els àcids grassos omega-3 al múscul esquelètic són importants per una acció eficaç de la insulina. El teixit adipós i el fetge representen els objectius primaris per als àcids grassos omega-3 en l'obesitat dietètica en ratolins, com s'evidencia per la inducció de la biogènesi mitocondrial i l'oxidació d'àcids grassos en el teixit adipós blanc epidídmal ¹⁷⁹ i la millora de la RI hepàtica de manera dependent a l'AMPK α ¹⁹².

És ben sabut que l'excés de greix corporal s'associa amb la RI. En humans l'oli de peix en la dieta pot reduir el contingut de greix corporal ¹⁹³, ja que indueix canvis metabòlics en diversos teixits, com ara l'estimulació de l'oxidació de lípids, la inhibició de la lipogènesi en el fetge ^{194,195} i l'estimulació de l'oxidació d'àcids grassos en el múscul ¹⁹⁶. En aquest context Flachs et al van observar que EPA i DHA tenen una regulació positiva de la biogènesi mitocondrial (estimulació PGC-1 α i NRF1) i la inducció de la β -oxidació ¹⁷⁹. També els omega-3 modulen l'activitat de factors de transcripció com els PPAR ¹⁹⁷ i s'ha observat que EPA i DHA promouen la biogènesi mitocondrial ¹⁹⁸. A més, hi ha estudis en els que ratolins knockout en AMPK α ¹⁹² o PPAR α ¹⁷⁷, l'omega-3 no prevé la RI. Per tant, encara que una de la hipòtesis més acceptada és que els omega-3 reverteixen la RI per la supressió de la inflamació ^{178,199}, es suggereix que els mecanismes per la sensibilitat a la insulina poden convergir en el mitocondri. En contrast, Lanza et al. indiquen que en un context de dieta hipergrassa els omega-3 no milloren la funció o contingut mitocondrial ¹⁰³.

3. OMEGA-3 I ESTRÈS OXIDATIU

Tot i els beneficis per a la salut associats amb el consum d'omega-3 i que s'ha indicat anteriorment, la suplementació amb omega-3 o el consum d'una dieta rica en aquests àcids grassos, pot ser desavantatjós per la funció cel·lular. Diverses investigacions han indicat una modulació dels olis de peix sobre l'equilibri redox, encara que tant *in vitro* com *in vivo* els experiments han mostrat resultats contradictoris. En l'administració *in vitro* de DHA sobre plaquetes humanes es va observar efectes antioxidants en dosis baixes i pro-oxidants en dosis altes ²⁰⁰. Encara que el DHA és un component important en les bicapes fosfolipídiques de les membranes on es manté la integritat estructural i funcional de les cèl·lules i dels orgànuls, aquesta acció pro-oxidant es va atribuir a l'alta acumulació de DHA en les membranes i la relació entre l'oxidació dels àcids grassos poliinsaturats i el grau d'insaturació. Una tendència similar es va trobar en un estudi d'intervenció nutricional en homes sans ²⁰¹.

De fet, la peroxidació de DHA en les membranes fosfolipídiques per ROS poden conduir a la formació de productes tòxics de baix pes molecular que han estat identificats com a factors mutagènics i aterogènics ^{202,203} i que podrien danyar a la membrana mitocondrial. Diverses investigacions han suggerit que tant DHA com l'oli de peix, però no EPA, tenen efectes beneficiosos sobre el metabolisme de les

lipoproteïnes i l'estrès oxidatiu ²⁰⁴. Una modulació redox diferencial entre EPA i DHA, poden explicar en part els resultats contradictoris. Tot i això en un estudi van suggerir l'eficàcia de l'oli de peix en la dieta en la reducció en el dany oxidatiu proteic *in vivo* per un augment dels nivells d'EPA i DHA en els teixits ²⁰⁵, aquest efecte antioxidant va ser dependent de la relació entre EPA i DHA, sent la relació 1:1 la més protectora contra la carbonilació de proteïnes.

En aquest capítol de la tesi es va voler estudiar l'efecte dels omega-3 en ratolins amb RI en un context de dieta hipercalòrica o normocalòrica incloent a la dieta una concentració que simulï els requeriments nutricionals en humans (500 mg/dia). Els procediments es van centrar en l'estudi de la sensibilitat a la insulina i el seu efecte en paràmetres relacionats amb el mitocondri i el dany oxidatiu proteic.

B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB OMEGA-3 EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC

Després del període de RI, els ratolins van ser alimentats amb una dieta normocalòrica o hipercalòrica i la seva combinació amb l'addició d'oli de peix com a font de DHA i EPA. A la dieta dels ratolins se'ls va afegir una concentració que simulava les ingestes dietètiques de referència d'àcids grassos omega-3 en humans (500 mg/dia). En la Taula 7 s'observa com les dietes hipercalòriques mostres més de 3 vegades d'àcids grassos. D'aquests s'observa un gran augment en els greixos saturats, així com de monoinsaturats i poliinsaturats. No obstant, encara que la dieta HC té més quantitat de poliinsaturats que la HC+OP, el que la diferencia és l'augment dels àcids grassos omega-3 en el grup HC+OP.

Taula 7. Composició en àcids grassos de les dietes normocalòrica i hipercalòrica amb l'addició d'oli de peix.

Àcids grassos	NC	HC	NC+OP*	HC+OP*
g/kg dieta	109	340	109	340
%Saturats	15	110	23	118
%Monoinsaturats	28	131	25	128
%Poliinsaturats	65	93	52	80
%Omega-6	63	85	37	59
%Omega-3	2	5	16	19

*Els àcids grassos analitzats en l'oli de peix representen el 80% (el 20% restant són altres àcids grassos no identificats).

1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC

Durant els dos mesos de tractament es va fer un seguiment setmanal del consum alimentari i del pes corporal i al finalitzar el tractament es va obtenir plasma per l'anàlisi del perfil lipídic. En la Figura 29 es mostra l'evolució del pes durant els dos mesos de tractament. El grup HC+OP augmenta de pes igual que el grup HC, sense haver-hi diferències entre aquests grups. En canvi en els dos grups amb dieta normocalòrica (NC i NC+OP) s'observa una disminució de pes, tot i que el grup NC+OP mostra una baixada més gradual. En el Control (línia roja) s'observa una corba d'augment de pes igual que els grups amb dieta hipercalòrica, encara que el seu pes inicial va ser menor a causa de la ingesta d'una dieta normocalòrica durant tot l'experiment.

S'observa un canvi en el pes corporal dels diferents grups en base a si la dieta és normocalòrica o hipercalòrica. Per tant, el canvi en el pes es deu principalment a la composició en macronutrients de la dieta, ja que amb l'addició d'omega-3 no s'observen canvis afegits a l'efecte propi de la dieta. Tal i com ja s'ha descrit en un estudi recent, els ratolins alimentats amb una dieta hipergrassa amb oli de peix van augmentar la massa corporal igual que els ratolins amb una dieta hipergrassa ¹⁰³.

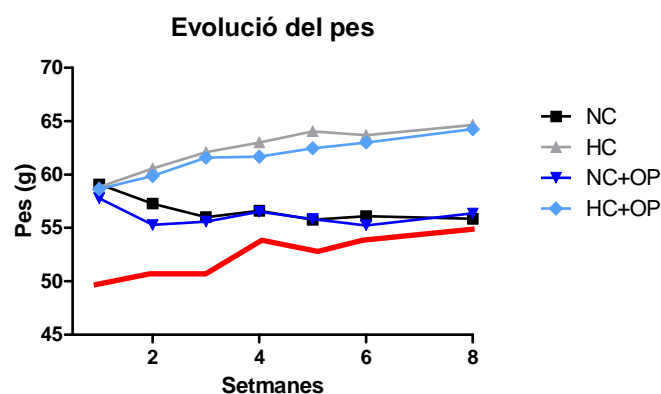


Figura 29. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb omega-3.
La línia roja indica l'evolució del pes del Control (dieta normocalòrica durant tot l'experiment).

Respecte el consum alimentari dels ratolins, en la Taula 8, al calcular els grams d'aliment ingerits tenint en compte el pes de l'animal, s'observa una diferència estadísticament significativa entre els grups NC+OP i HC+OP, consumint aquest últim grup una menor quantitat de dieta per pes. Al igualar la ingesta per les calories en base al pes corporal del ratolí, ja no s'observa una diferència estadística tot i que els ratolins HC+OP ingereixen una major quantitat calòrica.

En l'estudi del perfil lipídic, el colesterol total HDL i LDL va disminuir en el grup NC+OP, atribuint aquest efecte a l'oli de peix ingerit. No obstant, la disminució de HDL no sembla un efecte negatiu, ja que hi ha un augment de les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL. Respecte el grup HC+OP s'observa una disminució del colesterol total i LDL i un augment de HDL respecte el grup HC, a més també s'observa augment de les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL, mostrant l'oli de peix un efecte beneficiós en el perfil lipídic en els dos contextos de dietes. En els valors del colesterol LDL hi ha una disminució significativa en el grup NC+OP i finalment en els valors dels TG no s'observen diferències significatives entre els grups.

Taula 8. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb omega-3.

	NC	HC	NC+OP	HC+OP
Pes inicial (g)	59,1±9,3	58,8±8,7	57,8±7,6	58,6±5,5
Pes final (g)	55,9±8,0	64,7±9,8	56,4±6,7	64,3±6,0
Guany pes corporal (g)	-3,2±2,5	5,8±1,4 ^{a***}	-1,42±2,1 ^{b***}	5,6±1,2 ^{a,c***}
Consum d'aliment (g dieta setmana/g de pes animal)	0,55±0,06	0,47±0,11	0,54±0,03	0,41±0,03 ^{a**, c*}
Consum energètic (kcal setmana/g de pes animal)	2,13±0,23	2,79±0,67 ^{a*}	2,08±0,12 ^{b*}	2,42±0,18
Colesterol total (mg/dL)	188,6±55,5	239,0±60,7	130,1±30 ^{b**}	208,1±49,9
HDL (mg/dL)	106,1±24,1	117,5±23,4	88,8±9,2	126,0±13,5 ^{c*}
LDL (mg/dL)	114,8±38,2	104,1±25,3	44,7±13,9 ^{a*** b**}	98,3±24,4 ^{c*}
TG (mg/dL)	74,5±16,6	63,2±20,3	73,6±27,8	69,7±22,1
HDL/Col. Total	0,58±0,08	0,53±0,09	0,7±0,12	0,58±0,17
HDL/LDL	1,18±0,48	1,16±0,27	2,18±1,2	1,2±0,27

S'observen diferències estadísticament significatives en el pes corporal, el consum dietètic i en el perfil lipídic entre els grups. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p<0.05$ ^{*} $p<0.01$ ^{**} $p<0.001$ a amb respecte a NC, b amb respecte a HC, c comparant NC+OP i HC+OP). Les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL s'han calculat en base als resultats individuals (no s'ha calculat la relació en base al promig).

Aquests resultats van en relació amb altres estudis en els que s'ha observat que la suplementació amb omega-3 potencia els beneficis per a la salut de la restricció calòrica en humans ¹⁸⁶ i en ratolins obesos ¹⁸⁵. Tot i això, en aquest capítol no s'han observat canvis en els TG tal i com observen altres estudis amb rosegadors ^{182,184}. Respecte a la falta de significació en el perfil lipídic del grup HC+OP, a la literatura no hi ha una àmplia investigació sobre l'associació entre el consum d'omega-3 i la prevalença de SM. Per exemple, un estudi multicèntric publicat recentment no recolza

una associació entre la ingesta d'omega-3 i el SM en una població d'EUA, a més de no observar diferències significatives en el perfil lipídic entre grups ²⁰⁶.

Després del sacrifici es va extreure el contingut cecal dels ratolins i es va recol·lectar la femta per a poder estudiar el contingut de carbohidrats present en aquestes mostres. En la Figura 30 s'observa com els carbohidrats del contingut cecal en el grup NC+OP es superior als altres grups. Respecte a la femta no s'observen diferències significatives entre els grups. Probablement els efectes observats del perfil lipídic en el grup NC+OP també poden estar relacionats amb una menor absorció de carbohidrats com s'observa en el contingut cecal.

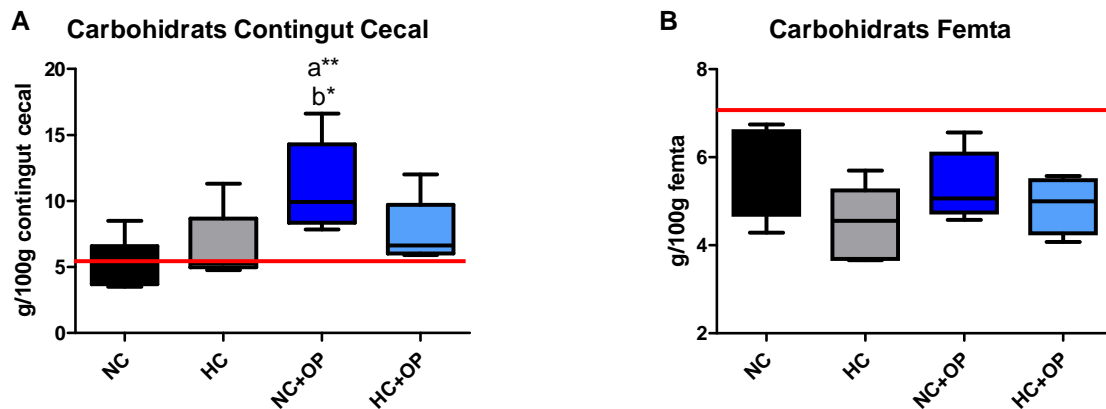


Figura 30. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Nivells de carbohidrats (g/100g) en el contingut cecal (A) i en la femta (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a NC, b amb respecte a HC).

A més, hi ha un estudi que indica que els omega-3 (oli de peix) redueixen l'absorció intestinal de glucosa i de lípids en condicions normals i en rates diabètiques, però que el seu efecte es veu alterat per la presència d'àcids grassos saturats en la dieta ²⁰⁷. Aquest estudi aniria en relació amb aquests resultats, ja que s'observa una menor absorció a nivell d'intestí prim de carbohidrats en el grup amb oli de peix en una dieta normocalòrica, però no en el grup amb oli de peix i una dieta hipercalòrica en la que hi ha un augment de greixos saturats. Tot i això, no hi ha evidència actual per entendre aquest comportament i seria necessari un estudi dels mecanismes d'acció a nivell molecular. No obstant, hi ha un estudi que indica que els omega-3 redueixen l'expressió del transportador de glucosa SGLT4 a la paret intestinal a través de l'activació de PPAR α ²⁰⁸, suggerint que aniria en relació amb l'augment de carbohidrats en el contingut cecal en el grup amb dieta normocalòrica i que aquest efecte es podria perdre amb l'addició de greix a la dieta.

Un cop analitzats els canvis que s'han produït en la ingesta, pes i perfil lipídic, es vol observar si l'omega-3 influeix en el metabolisme de la glucosa. Per tant, al punt final de l'experiment es va determinar la sensibilitat a la insulina.

2. SENSIBILITAT A LA INSULINA

Per determinar la sensibilitat a la insulina, es va realitzar una corba de tolerància a la glucosa, una corba de resposta glucèmica a la insulina i es va avaluar la fructosamina, GLUT4, GLUT2 i AMPK α en teixits diana de sensibilitat a la insulina.

En la Figura 31 es pot observar la corba de tolerància a la glucosa i la glucèmia en resposta a la insulina amb les seves corresponents àrees sota la corba. Per realitzar la corba de tolerància a la glucosa, es van mesurar els nivells de glucosa al temps basal, 20, 40, 60 i 120 minuts després de la injecció de 2 g de glucosa per kg de pes del ratolí. Per realitzar la corba de glucosa en resposta a la insulina, es va mesurar la quantitat de glucosa a diversos temps (basal, 0, 20, 40, 60 i 120 minuts) després de la injecció d'insulina.

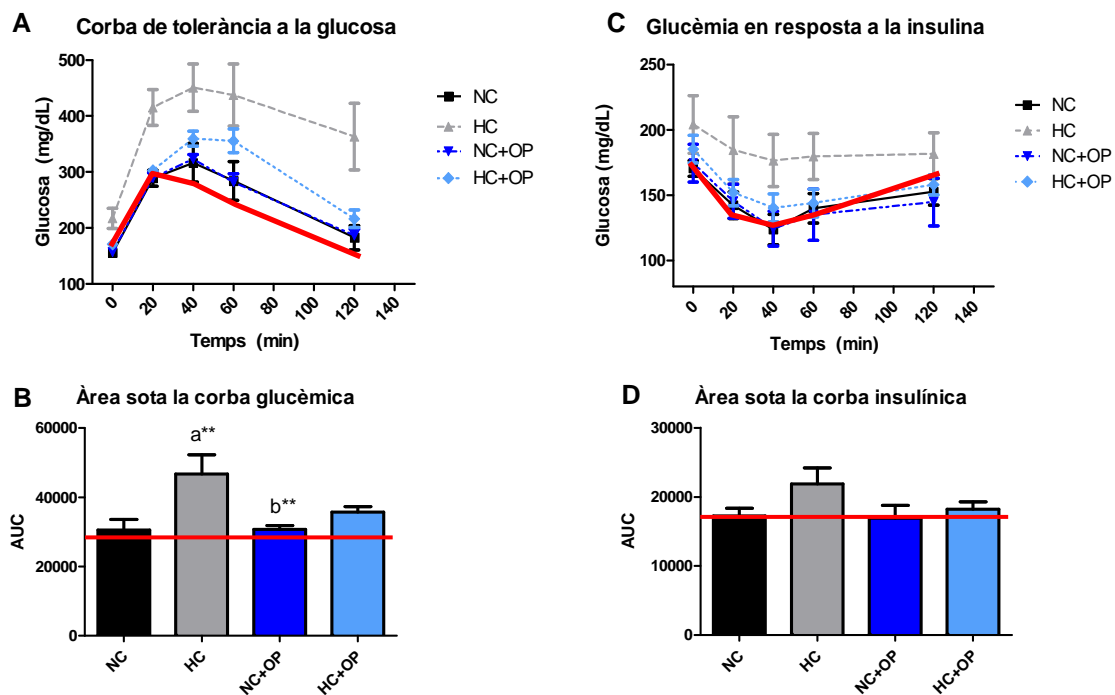


Figura 31. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Corba de tolerància a la glucosa (A) i la seva corresponent àrea sota la corba (B) i Resposta glucèmica a la insulina (C) i la seva corresponent àrea sota la corba (D). La línia roja indica el Control. En la corba de tolerància a la glucosa (A) s'observen diferències en tots els grups de la corba. Al minut 0 hi ha diferències en els grups NC+OP i HC+OP respecte HC ($p<0.01$ i $p<0.05$ respectivament). Al minut 20 en els grups NC+OP i HC+OP respecte HC ($p<0.001$). Als minuts 40 i 60 s'observen diferències en el grup NC+OP respecte HC ($p<0.05$). Al minut 120 hi ha diferències en els grups NC+OP i HC+OP respecte HC ($p<0.01$). En la glucèmia en resposta a la insulina (C) no s'observen diferències entre els grups. Les diferències entre NC i HC de la Figura 31A i 31C es comparen en la Figura 7. Els valors marcats en la Figura 31B i 31D mostren diferències significatives entre grups ($p<0.05$, $^a p<0.05$, $^b p<0.01$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

Com s'observa en la Figura 31A el grup NC i NC+OP que van ingerir una dieta normocalòrica segueixen un patró igual de tolerància a la glucosa i no s'observen diferències entre aquests grups, per tant a l'omega-3 no se li atribueix cap efecte afegit respecte la corba de glucosa quan s'ingereix amb una dieta normocalòrica. I a més, en el grup NC+OP no s'observa una recuperació als nivells del Control (línia roja). En canvi, en el grup HC+OP, tot i que s'observa un increment de la glucèmia en el minut 60, el punt inicial i el punt final és el mateix que amb una dieta normocalòrica, mostrant gairebé el mateix patró que els dos grups amb el tractament amb una dieta normocalòrica. Aquests valors es poden veure reflectits en la gràfica de l'àrea sota la corba (Figura 31A), on el grup HC mostra diferències significatives respecte NC i NC+OP i encara que la diferència no sigui significativa hi ha una disminució en el grup HC+OP respecte HC. En aquest sentit, al finalitzar el període de dos mesos d'intervenció dietètica, l'omega-3 amb una alimentació rica en greixos millora la tolerància a la glucosa, sense modificar el pes corporal.

Respecte a la corba de glucosa en resposta a la insulina (Figura 31C), s'observa que els grups NC, NC+OP i HC+OP tenen un comportament similar i a més retornen als nivells normals com el grup Control (línia roja). El grup HC no respon igual a la insulina, sent més resistent a l'acció de la insulina, encara que no s'observen diferències significatives entre grups en l'àrea sota la corba (Figura 31D).

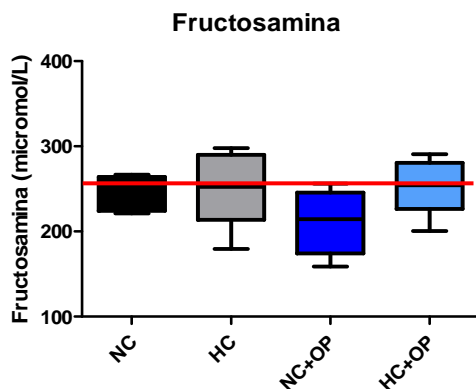


Figura 32. Concentració de fructosamina després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Concentració de fructosamina (micromol/L) en plasma. La línia roja indica el Control. No s'observen diferències entre grups tot.

També es va mesurar la concentració de fructosamina (Figura 32) que ens indica la mitjana de glucosa en sang en un període curt de temps (2-3 setmanes). En els diferents grups no s'observen diferències significatives en els nivells de fructosamina, però s'observa una tendència a disminuir la fructosamina en el grup de dieta NC+OP indicant que l'omega-3 en el context de dieta normocalòrica ajuda a millorar els nivells de glucosa en un termini mitjà.

En la Figura 33 s'ha analitzat la quantitat de GLUT4 en el teixit muscular i adipós. En el múscul s'observen diferències significatives entre el grup NC que retorna als nivells del Control i els altres grups on encara es mostren uns nivells més baixos. En canvi, en el teixit adipós s'observa un augment significatiu en el grup NC+OP respecte

els grups amb una dieta normocalòrica. Però encara que hi continuï havent una disminució significativa en el grup HC+OP respecte el Control (línia roja) aquesta diferència és menor que el grup HC. És a dir, que l'increment en la quantitat de GLUT4 al teixit adipós podria explicar la millora en la tolerància a la glucosa observada en el grup NC+OP. Respecte el GLUT2 en el fetge no s'observen diferències significatives entre grups, tot i que els tractaments amb omega-3 presenten una tendència a la disminució respecte NC.

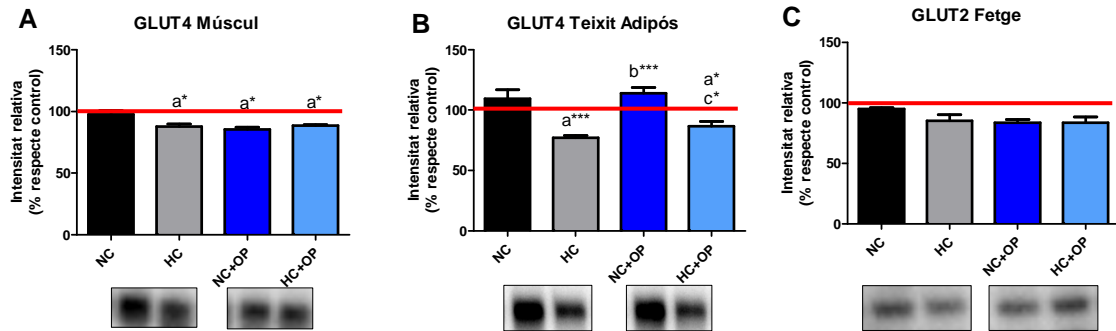


Figura 33. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació per densitometria de GLUT4 en múscul (A) i teixit adipós (B) i de GLUT2 en fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$, a amb respecte a NC, b amb respecte a HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

A l'analitzar l'AMPK α (Figura 34), al múscul no s'observen diferències significatives, encara que hi ha una tendència a l'augment en els dos grups que van ingerir oli de peix, retornant als valors del Control. En el teixit adipós, no s'observen diferències significatives entre els grups amb una dieta normocalòrica o hipercalòrica, però hi ha una tendència cap a l'augment en els dos grups amb oli de peix a la dieta. En el fetge, tot i que no s'observen diferències significatives entre grups, els dos grups amb una ingesta d'oli de peix van mostrar els mateixos nivells que el grup NC i per tant, una tendència a l'augment respecte HC.

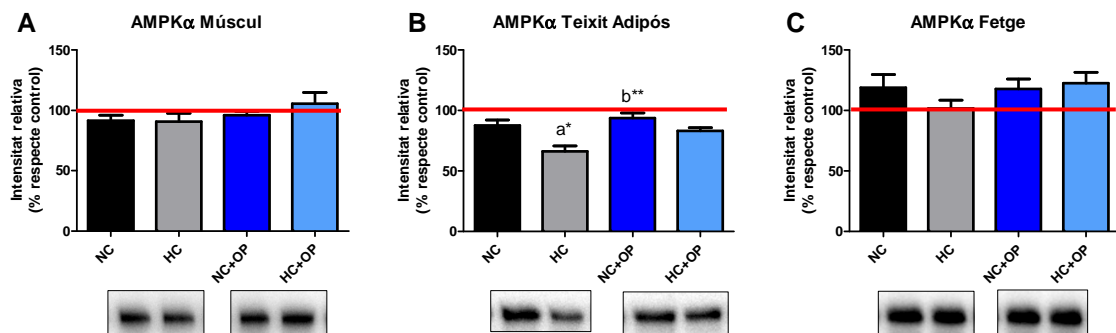


Figura 34. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació d'AMPK α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$, a amb respecte a NC i b amb respecte a HC).

El resultat net de l'activació d'AMPK incrementa la transcripció de GLUT4⁹¹. Això podria explicar el resultat observat en el teixit adipós que està relacionat amb els valors observats en el GLUT4. S'ha estudiat que els omega-3 milloren l'activitat de l'AMPK al teixit adipós prevenint el desenvolupament de la intolerància a la glucosa^{209, 210}. Tot i aquesta evidència, en aquest estudi no s'observa un augment significatiu de l'AMPK α al teixit adipós en els ratolins alimentats amb omega-3 respecte el grup Control, possiblement perquè els ratolins ja anteriorment eren insulinoresistents i s'utilitza l'omega-3 com a tractament i no com a prevenció.

Juntament amb la normalització de la corba de glucosa i la corba de glucosa en resposta a la insulina i amb una tendència a l'augment dels nivells de GLUT4 en el teixit adipós, aquestes observacions estan en relació amb diversos estudis anteriors que mostraven que l'omega-3 de la dieta va millorar la sensibilitat a la insulina en rosegadors amb SM¹⁹² i que a més prevenien la RI induïda per una dieta hipergrassa en rosegadors^{103,177,178}. No obstant, des del punt de vista dels anàlisis de GLUT4, GLUT2 i AMPK α no es pot explicar la millora en la RI del grup HC+OP. A continuació, es vol estudiar si els canvis observats en la sensibilitat a la insulina amb l'addició d'omega-3 modifiquen l'ADNmt i les proteïnes relacionades amb el mitocondri.

3. CANVIS EN L'ADNmt I LES PROTEÏNES MITOCONDRIALS

3.1. ADNmt

Quan s'avalua el nombre mitocondrial (Figura 35) per l'avaluació de la relació d'ADNmt i ADN nuclear, s'evidencia en el múscul una disminució en el grup NC+OP respecte els altres grups. En els altres teixits no s'observa una diferència significativa entre grups, encara que en el teixit adipós en el grup HC+OP s'observa una disminució respecte els altres grups.

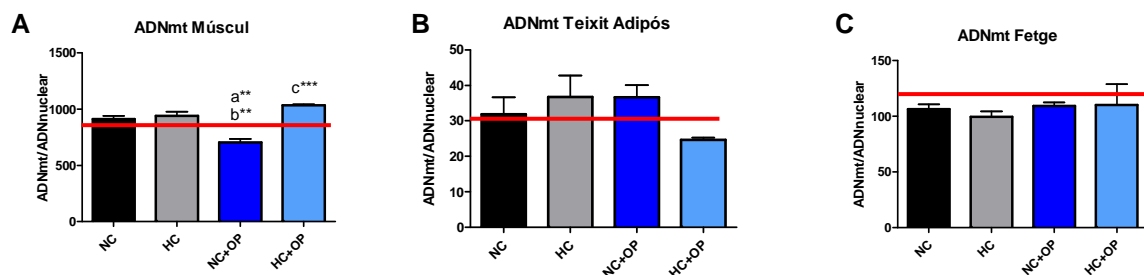


Figura 35. Avaluació del ADNmt després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Avaluació del ADNmt (la quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant el marcador Cytb i es normalitza i es determina segons l'amplificació del gen Actb utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta Ct}$)) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

3.2. PORINA

S'observa en la Figura 36 un augment significatiu en el múscul de la porina en els dos grups en els que se'ls va incloure oli de peix a la dieta respecte els altres grups, retornant als nivells del Control (línia roja). Aquest increment en la porina al múscul amb l'addició d'oli de peix pot estar relacionat amb un major flux de substrats i per consegüent, a un major grau de metabolització energètica, la qual, podria explicar la millora de la RI en el grup HC+OP.

En el teixit adipós s'observa una disminució respecte el grup NC en els dos grups amb una dieta hipercalòrica, tot i que tenen pràcticament els mateixos nivells que el Control. En canvi en el fetge s'observa un augment significatiu en els grups amb una dieta normocalòrica respecte els d'una dieta hipercalòrica i a més s'observen valors majors que el Control.

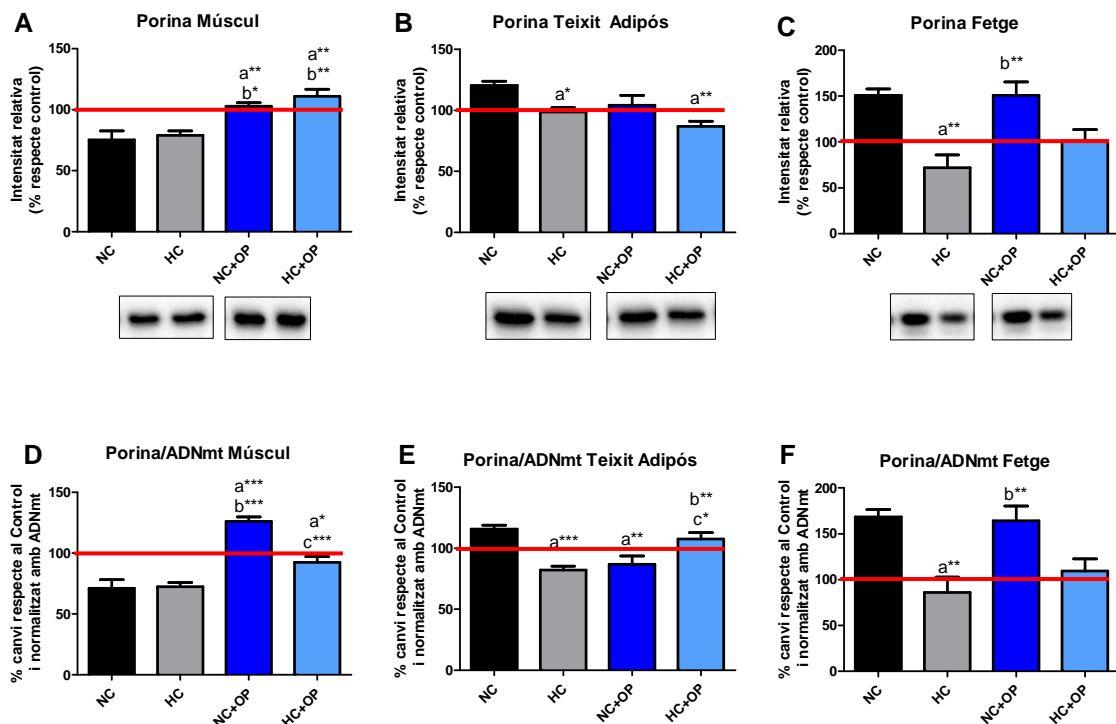


Figura 36. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de la porina per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) i normalitzada amb l'ADNmt en múscul (D), teixit adipós (E) i fetge (F). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP)

Quan es normalitza la porina amb l'ADNmt, s'observa en el múscul un augment significatiu en el grup NC+OP, en canvi, el grup HC+OP disminueix els seus valors tot i que són els mateixos que el grup Control. En el teixit adipós hi ha un augment

significatiu respecte HC en el grup HC+OP retornant a uns nivells com el Control. I en el fetge s'observen els mateixos canvis que sense normalitzar amb l'ADNmt a causa de les poques diferències entre grups en l'ADNmt.

3.3. CANVIS EN ELS COMPLEXOS MITOCONDRIALS

Per estudiar si hi ha una alteració en la capacitat funcional del mitocondri amb la ingesta d'omega-3, es va avaluar el contingut de proteïnes de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, així com també proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial i en la morfologia dels mitocondris en el fetge, múscul i teixit adipós dels ratolins.

3.3.1. Complexos mitocondrials en el múscul

Respecte els complexos analitzats en el teixit muscular (Figura 37) s'observa com en els quatre complexos, tant el grup NC+OP i HC+OP retornen als nivells normals (Control línia roja), per tant reverteixen la pèrdua del complex IV a uns valors com el Control.

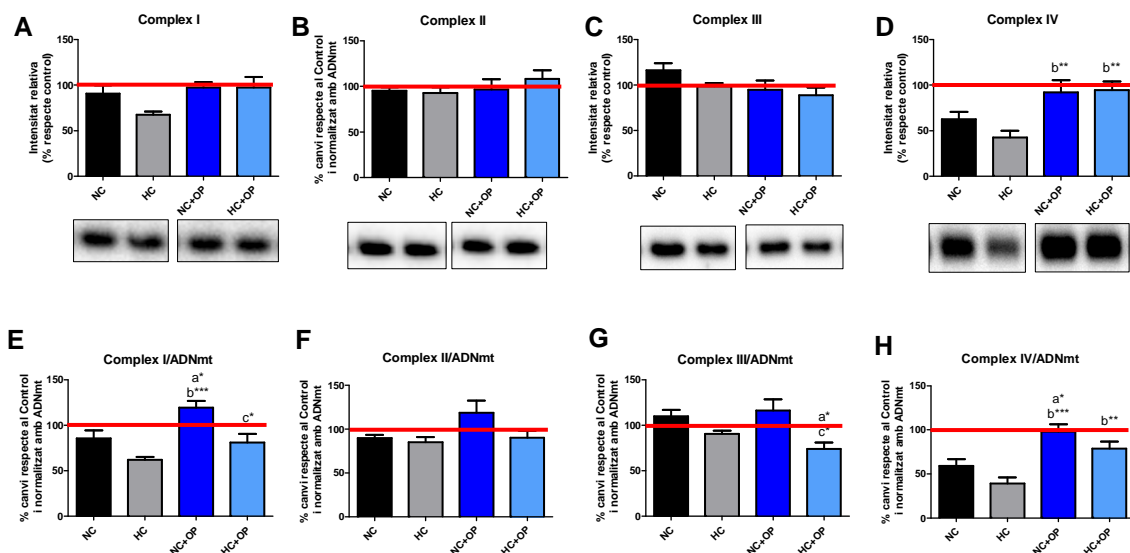


Figura 37. Quantificació dels complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit muscular (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). a amb respecte Control, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

En aquest sentit, els omega-3 reverteixen la disminució dels complexos independentment de la dieta. A més, quan es normalitzen els complexos amb l'ADNmt s'observa un augment en els complexos en el grup NC+OP ja que aquest grup va mostrar una menor quantitat d'ADNmt.

3.3.2. Complexos mitocondrials en el teixit adipós

En els complexos mitocondrials del teixit adipós (Figura 38) s'observen els mateixos nivells en el complex I i una recuperació en el grup NC+OP respecte el Control (línia roja) en el complex II i IV i fins i tot en el complex III hi ha un augment respecte el Control. Per tant, en un context de dieta hipercalòrica en el teixit adipós, l'omega-3 no confereix un canvi afegit en la quantitat total de complexos mitocondrials.

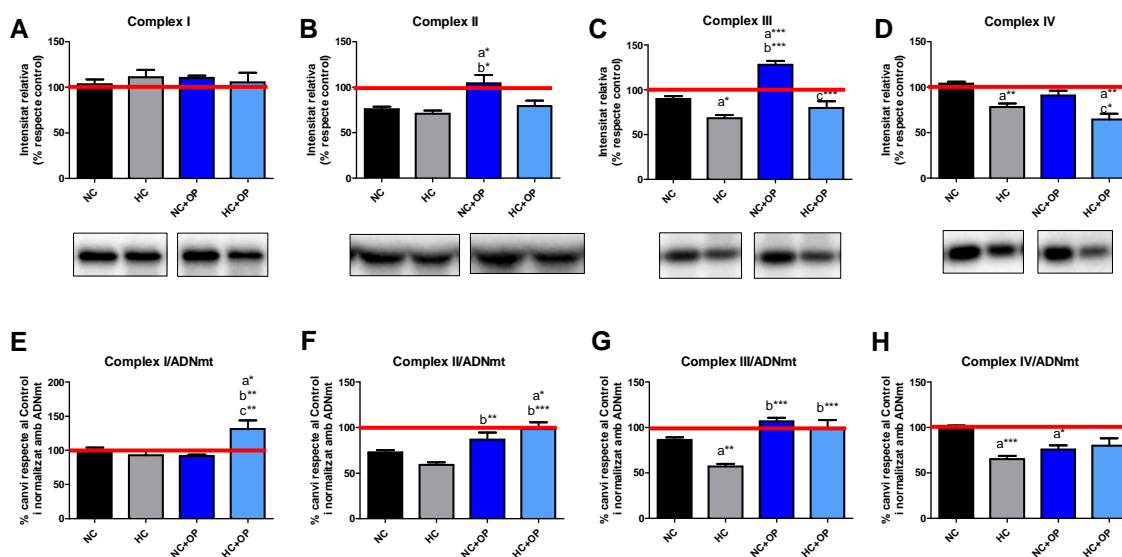


Figura 38. Quantificació dels complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit adipós (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$. a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP)

No obstant, quan els complexos es normalitzen amb l'ADNmt s'observa un increment dels complexos I, II i III en el grup HC+OP retornant als nivells del Control o fins i tot en el complex I hi ha un augment respecte el Control.

3.3.3. Complexos mitocondrials en el fetge

En el fetge (Figura 39) s'observa un comportament similar entre els dos grups amb ingesta d'oli de peix i el Control o el grup NC. Per tant, encara que la dieta sigui

hipercalòrica, l'addició d'oli de peix fa que en els complexos hi hagi un comportament igual que la dieta normocalòrica. El fet que no hi hagi diferències en l'ADNmt, al normalitzar els complexos amb l'ADNmt aquests tenen el mateix comportament que els complexos sense normalitzar.

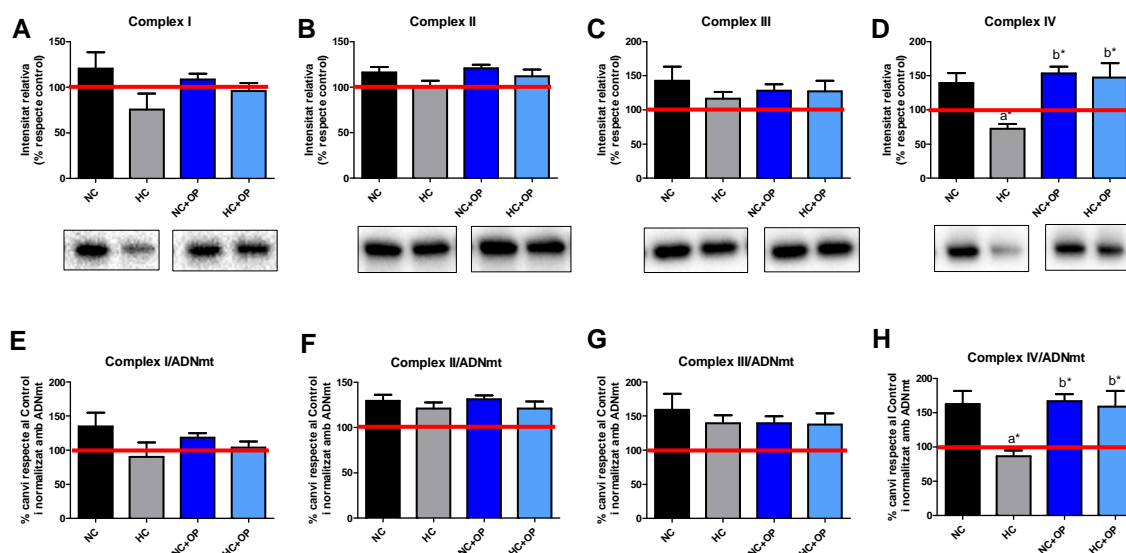


Figura 39. Quantificació dels complexos mitocondrials en el fetge després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el fetge (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $^{**}p < 0.01$ $^{***}p < 0.001$. a amb respecte Control, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

Com s'ha pogut comprovar fins ara els canvis soferts en el metabolisme energètic s'han vist reflectits en l'ADNmt, la porina i els complexos mitocondrials. A continuació es vol observar si aquests canvis estan relacionats amb les vies de senyalització SIRT1, PGC-1 α i MFN2 que juguen un paper important en la regulació del metabolisme i la biogènesi mitocondrial.

3.4. SIRT1

En la Figura 40 es pot observar en el múscul que la proteïna SIRT1 està augmentada en el grup HC+OP respecte NC i HC. En el grup NC+OP s'observa com els valors retornen als nivells normals del Control (línia roja). En el teixit adipós els nivells continuen estan disminuïts en els grups NC+OP i HC+OP. Respecte el fetge s'observa un augment en els dos grups amb oli de peix respecte els altres grups i el grup Control.

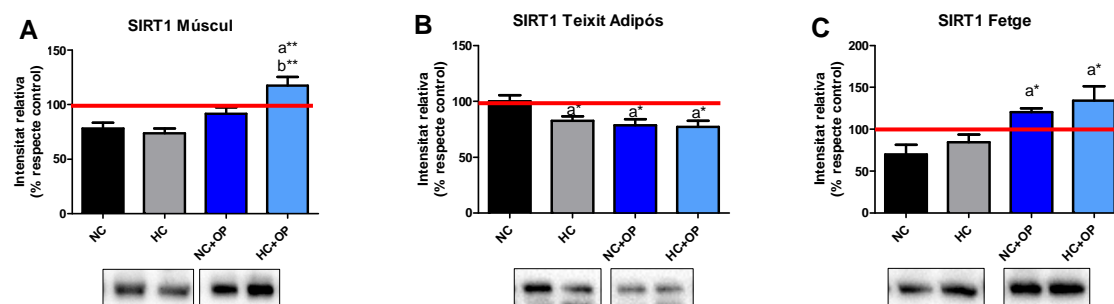


Figura 40. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de SIRT1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències entre els grups ($p < 0.05$ ^{*} $p < 0.01$ ^{**} $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC).

3.5. PGC-1 α

En les gràfiques següents (Figura 41) no s'observen diferències significatives entre els grups al teixit muscular, tot i la tendència a l'augment en els dos grups amb una ingesta d'oli de peix. En canvi, en el fetge i teixit adipós s'observa un augment significatiu en els dos grups amb oli de peix respecte el Control, NC i HC. Així doncs, l'addició d'oli de peix a les dietes confereix un valor afegit en el teixit adipós i al fetge.

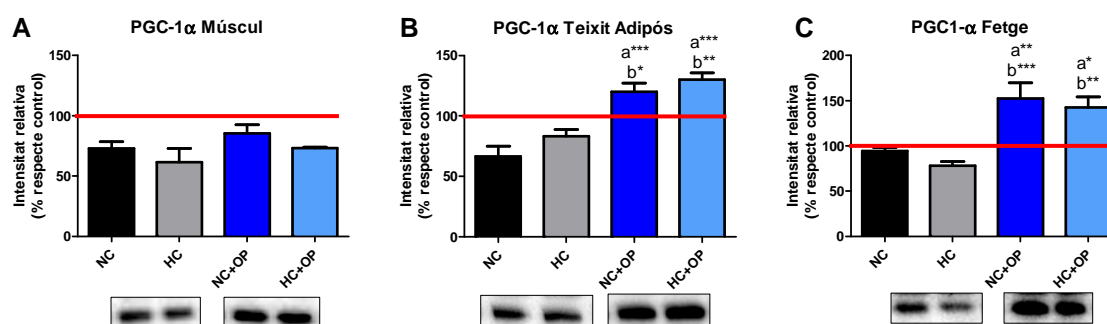


Figura 41. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de PGC-1 α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferència significativa entre els grups ($p < 0.05$ ^{*} $p < 0.01$ ^{**} $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC).

3.6. MFN2

En les gràfiques següents (Figura 42) s'observa en el múscul un augment de MFN2 en els dos grups amb oli de peix respecte els altres dos grups i retornant així als nivells normals del Control. En el teixit adipós s'observa un augment en el grup NC+OP respecte NC i HC i el grup HC+OP té uns nivells iguals que el grup Control. En el fetge els dos grups amb dieta normocalòrica augmenten els nivells del grup Control, per tant, en el fetge els canvis observats s'atribueixen al canvi del tipus de dieta i no a l'addició d'oli de peix.

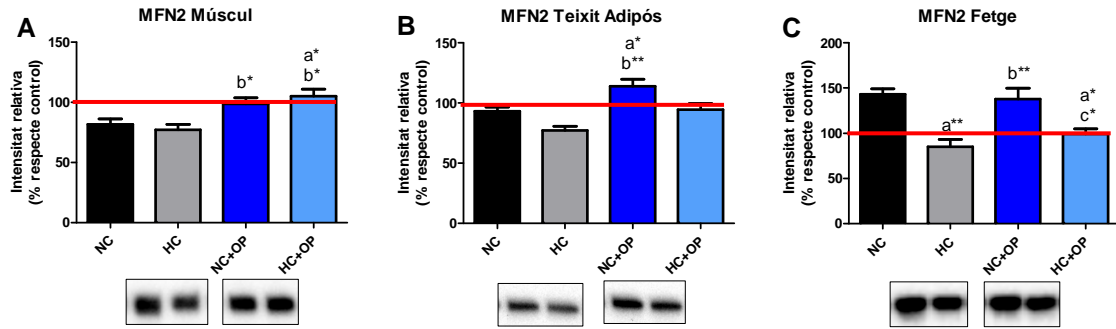


Figura 42. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de MFN2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.001$. a amb respecte a NC, b amb respecte a HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

Per tant, respecte l'ADNmt i les proteïnes relacionades amb el mitocondri, s'observa que l'addició d'oli de peix té efecte afegits, observant-se en alguns casos el mateix comportament encara que la dieta sigui normocalòrica o hipercalòrica.

En general, hi ha canvis en els complexos mitocondrials. En la porina del múscul s'observa un augment en els dos grups sent els nivells igual que el Control i aquest efecte podria estar relacionat amb un augment de SIRT1 i MFN2. En el teixit adipós s'observa un augment de PGC-1 α en els dos grups amb l'addició d'oli de peix, encara que MFN2 solament està augmentada en el grup NC+OP. En el fetge també s'observa un augment de PGC-1 α en els dos grups amb l'addició d'oli de peix.

3.7. BCL2

BCL2 es considera una proteïna anti-apoptòtica mitocondrial i els resultats es mostren en les següents gràfiques (Figura 43).

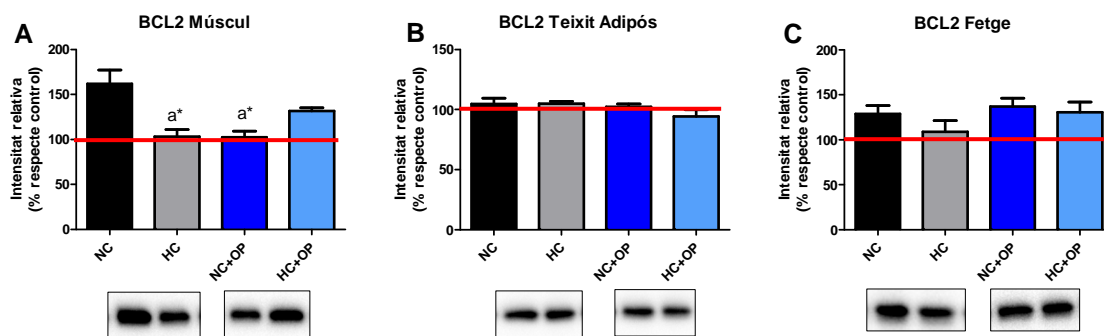


Figura 43. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de BCL2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) després de dos mesos de tractament amb omega-3. La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ a amb respecte NC).

En el múscul s'observa com el grup NC+OP retorna als nivells del Control i en el grup HC+OP s'observa un increment respecte el Control. En el teixit adipós no s'observen diferències entre grups, sent els valors iguals que el Control i en el fetge s'observa un augment respecte el Control en els grups NC+OP i HC+OP encara que les diferències no són significatives.

4. DANY OXIDATIU

4.1. DANY OXIDATIU PROTEIC DIRECTE

En la Figura 44 s'observa un augment significatiu dels nivells del marcador SAG en el múscul en el grup HC+OP. En canvi, en el teixit adipós s'evidencia una disminució en el grup HC+OP. En el fetge no s'observen diferències significatives entre grups.

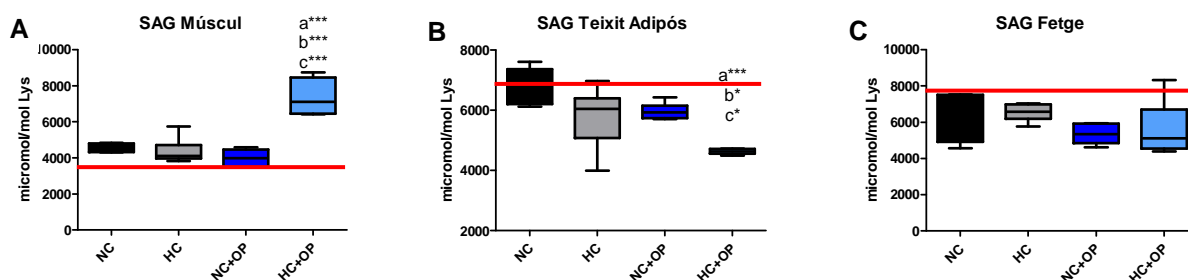


Figura 44. Nivells de semialdehid glutàmic (SAG) després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Nivells de SAG (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ *** $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

4.2. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICOXIDACIÓ

En la Figura 45 s'observa una diferència significativa en els nivells del marcador CEL en múscul del grup HC+OP entre els diferents grups. No s'evidencien diferències significatives en els altres dos teixits on els valors són similars que el grup Control (línia roja).

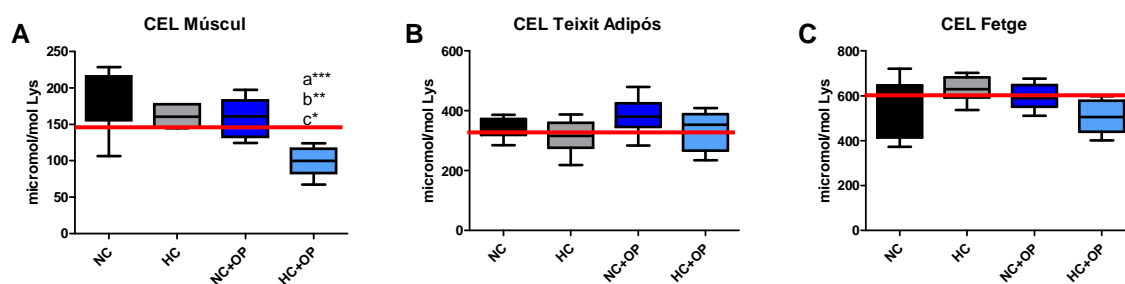


Figura 45. Nivells de Nε-(Carboxietil)lisina (CEL) després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Nivells de CEL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $p < 0.01$ $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

4.3. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LIPOXIDACIÓ

En la Figura 46 els nivells del marcador MDAL es veuen significativament disminuïts en els dos grups amb una dieta hipercalòrica (HC i HC+OP) en el teixit adipós. En el múscul i fetge no s'observen diferències significatives entre els grups.

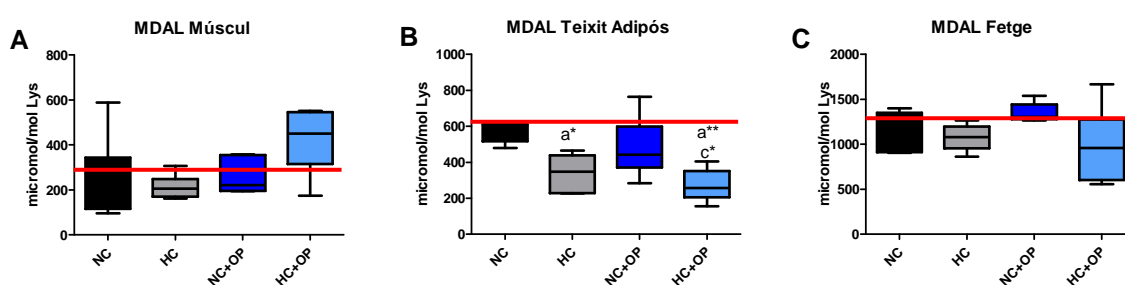


Figura 46. Nivells de malondialdehid-lisina (MDAL) després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Nivells de MDAL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $p < 0.01$ a amb respecte NC i b comparant NC+OP i HC+OP).

4.4. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICO I LIPOXIDACIÓ

En la Figura 47 s'observen diferències significatives en el marcador CML i CMC en el teixit muscular en el grup HC+OP respecte als altres grups. No s'observen diferències significatives entre grups en els altres teixits.

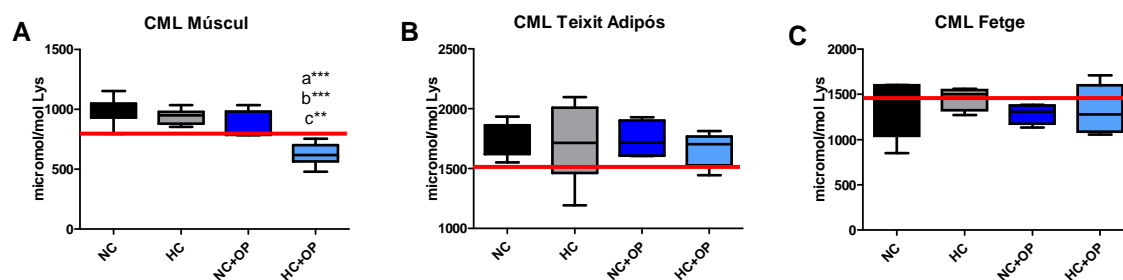


Figura 47. Nivells de Ne-(carboximetil)lisina (CML) després de dos mesos de tractament amb omega-3. Nivells de CML (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

4.5. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LA REACCIÓ DEL FUMARAT AMB LA CISTEÏNA

S'ha utilitzat el marcador 2-Succinyl-Cysteine (2SC), que deriva de la reacció del fumarat (del cicle de Krebs) amb la cisteïna. El 2SC pot ser un biomarcador útil de l'estrès mitocondrial a la diabetis ¹³⁸. En la Figura 48 no s'observen diferències entre els grups en els diferents teixits.

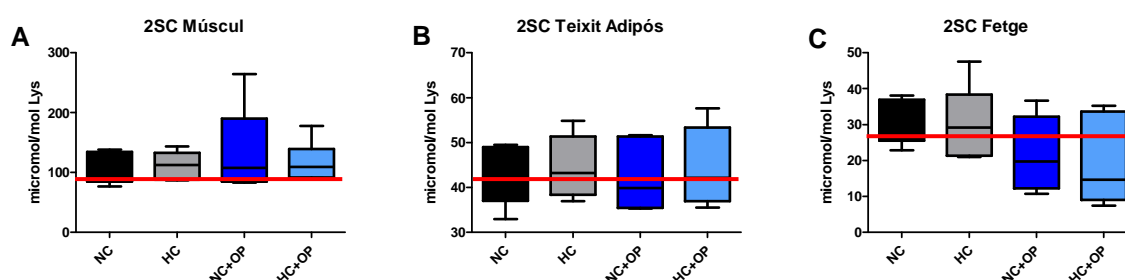


Figura 48. Nivells de 2-succinyl-cysteine (2SC) després de dos mesos de tractament amb omega-3. Nivells de 2SC (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. No s'observen diferències significatives entre grups i teixits.

4.6. ENZIM ANTIOXIDANT SOD1

La superòxid dismutasa (SOD) representa la defensa cel·lular primària contra els radicals superòxid. En la Figura 49 s'observa com el grup HC+OP mostra una tendència a igualar els nivells del Control en el múscul, en canvi, en el grup NC+OP s'observa una disminució de SOD1 respecte els altres grups. En el teixit adipós tampoc s'observen diferències entre grups i els nivells són pràcticament iguals que el grup Control (línia roja). En el fetge, no hi ha diferències significatives entre grups tot i que els valors són majors que el grup Control.

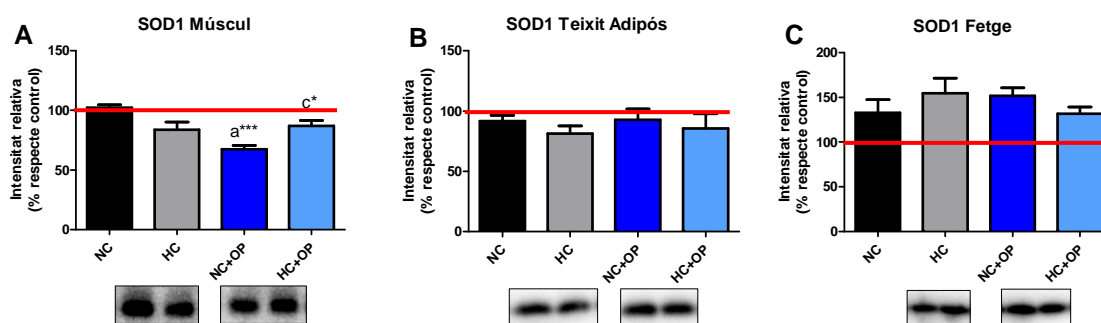


Figura 49. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Quantificació de SOD1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.005$ a amb respecte NC i c comparant NC+OP i HC+OP).

5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA

Tot i que s'ha descrit l'oli de peix com una font antioxidant ²¹¹, en la Figura 50A no s'observa un augment dels nivells respecte el Control. La capacitat antioxidant del plasma pot provenir de diferents fonts, com per exemple de l'àcid úric ²¹², per tant, s'ha mesurat l'àcid úric en plasma. En la Figura 50B s'observa una disminució de l'àcid úric en els dos grups amb una ingesta d'oli de peix i per tant, no s'observa una correlació entre els nivells de FRAP i l'àcid úric, suggerint que la capacitat antioxidant observada en el plasma no es deguda a un augment de l'àcid úric i atribuïnt-ho a la ingesta d'omega-3.

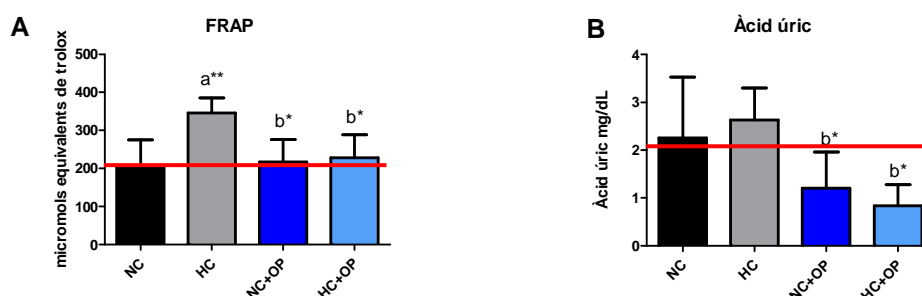


Figura 50. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb omega-3.

Capacitat antioxidant pel mètode FRAP (micromols equivalents de trolox) del plasma (A) i determinació de l'àcid úric (mg/dL) del plasma (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ a amb respecte a NC i b amb respecte HC).

C. DISCUSSIÓ

Està descrit que la suplementació amb omega-3 indueix una major tolerància a la glucosa en ratolins ¹⁰³ i millora la sensibilitat a la insulina en ratolins amb SM ¹⁹². En aquest capítol s'ha observat que els ratolins amb una ingesta d'oli de peix van millorar la sensibilitat a la insulina en un context de dieta hipercalòrica i de forma independentment a la dieta i al pes del ratolí. Per un altre costat, l'addició d'omega-3 en un context de dieta normocalòrica no va produir canvis afegits en la corba de glucosa i en la reducció de pes. Respecte el perfil lipídic s'observa una disminució del colesterol total i un augment de les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL en els dos contextos de dieta amb l'addició d'omega-3, oferint per tant un efecte hipolipemiant.

S'ha observat que els canvis en la composició d'àcids grassos de la membrana cel·lular del múscul quan s'afegeix omega-3 a la dieta poden alterar la composició dels fosfolípids de la membrana de les cèl·lules conferint efectes beneficiosos en l'acció de la insulina ¹⁷⁶. Addicionalment, varis estudis suggereixen que els omega-3 són mediadors de l'expressió gènica a través dels PPARs i que controlen l'expressió dels gens implicats en el metabolisme dels lípids i la glucosa i l'adipogènesi ²¹³. Respecte això, encara que no hi ha un canvi en el pes corporal i en la ingesta dietètica, la incorporació de l'omega 3 produeix una disminució dels nivells dels lípids i un augment de la sensibilitat a la insulina, a més d'una disminució en alguns marcadors del dany oxidatiu proteic que poden estar relacionats amb els canvis en la composició de la membrana cel·lular.

Els resultats obtinguts mostren que es van produir canvis en les proteïnes relacionades amb el mitocondri com SIRT1, complexos mitocondrials, PGC-1 α i MFN2 en els dos grups amb una ingesta d'oli de peix (NC+OP i HC+OP). S'ha observat que ratolins deficients en AMPK o PPAR α l'omega-3 no va prevenir la RI ^{177,192}, suggerint per tant, que els omega-3 poden influir en el mitocondri en la millora de la sensibilitat a la insulina. Si es posa atenció en els canvis en les proteïnes relacionades amb el mitocondri s'ha de destacar que respecte la memòria metabòlica observada amb una dieta normocalòrica en el múscul, amb els omega-3 es retorna a nivells del control o superior en els complexos, porina, SIRT1 i MFN2.

Respecte MFN2, el seu augment podria estar relacionats amb l'augment de la sensibilitat a la insulina, ja que s'ha observat una reducció de l'expressió de MFN2 en múscul esquelètic de pacients amb DM2 ¹²³ i recentment també s'ha observat una

disminució de MFN2 en el teixit hepàtic de rates alimentades amb una dieta amb llard de porc en comparació amb rates alimentades amb oli de peix ²¹⁴. Tot i l'augment dels complexos i MFN2 en el grup NC+OP en el múscul, hi ha una disminució de l'ADNmt en aquest grup. Per tant, hi ha una disminució de mitocondris, però possiblement amb una morfologia diferent, ja que hi ha un augment dels complexos mitocondrials i de la porina. Un article recent indica que rates alimentades amb una dieta amb oli de peix van tenir un menor grau d'esteatosi hepàtica a través de la fusió mitocondrial i la millora de la utilització d'àcids grassos ²¹⁴.

A la literatura es poden trobar estudis contradictoris sobre l'augment de la biogènesi mitocondrial amb una ingesta d'omega-3, o si aquest augment de la biogènesi mitocondrial solament es dona en un context de dieta normocalòrica. Per exemple Lanza et al. no van observar un increment de l'ADNmt en els ratolins alimentats amb una dieta hipergrassa amb omega-3 ¹⁰³. No obstant, hi ha estudis que mostren un augment de la biogènesi mitocondrial amb omega-3. Així, per exemple, un estudi recent demostra que la combinació de la restricció calòrica amb l'omega-3 té efectes additius en la inducció de la biogènesi mitocondrial i el catabolisme dels lípids fet que es podria explicar per la formació de mediadors lipídics antiinflamatoris derivats de l'omega-3 ¹⁸⁵.

Curiosament, en el grup HC+OP, es va observar una disminució del dany proteic en els marcadors CEL i CML al múscul i dels marcadors GSA i MDAL en el teixit adipós. En aquest grup els nivells de la SOD1 en el múscul i el teixit adipós són iguals que el grup HC, per tant es suggereix que la disminució del dany oxidatiu proteic vindria donat per una acció dels omega-3 en un context de dieta hipercalòrica, ja que el grup NC+OP no mostra una disminució del dany en els diferents marcadors. Contràriament a aquestes observacions on no es veu un augment de la SOD1, els resultats d'un estudi van mostrar que ratolins amb sobreexpressió de SOD1 van ser protegits d'una dieta alta en greix que induïa intolerància a la glucosa, ja que van mostrar una reducció significativa del dany oxidatiu ¹⁴⁶. Respecte BCL2 s'observa un augment en el múscul en el grup HC+OP, fet que es podria atribuir al haver-hi menys dany proteic en aquest grup. Entre els diferents complexos, el complex I i III són els màxims productors de ROS al mitocondri. Per tant, podria estar relacionat la disminució del complex I/ADNmt i del complex III/ADNmt amb la disminució d'algun marcador del dany oxidatiu proteic en el múscul del grup HC+OP.

S'ha observat que un increment en el dany oxidatiu tendeix a modificar l'equilibri entre fusió i fissió mitocondrial, induint una major expressió de proteïnes de fissió mitocondrial (DRP1) i la inhibició de la fusió (MFN2) reduint considerablement la seva funcionalitat ²¹⁵. Els resultats d'aquest capítol van en aquesta línia a l'observar que hi ha una disminució del dany oxidatiu al múscul del grup HC+OP i a més s'observa un augment de MFN2 en el múscul d'aquest grup. Possiblement aquesta reducció de l'estrès oxidatiu és per la menor acumulació dels lípids mitjançant la utilització dels àcids grassos mitocondrials gràcies a probablement una millora mitocondrial cap a la fusió i que contraresta l'estrès oxidatiu que es podria produir per un excés d'alimentació a llarg termini.

En aquest capítol es podria suggerir que gràcies a la regulació de la glucosa i el metabolisme dels lípids pels omega-3, hi ha una reducció del dany oxidatiu i uns canvis en les proteïnes relacionades amb el mitocondri en el grup HC+OP. Per tant, s'ha observat que l'omega-3 té efectes beneficiosos en el tractament de la RI i que protegeix a la RI provocada per una dieta alta en greixos ja que se li atribueix a una disminució d'alguns marcadors del dany oxidatiu a les proteïnes i una normalització de la memòria metabòlica en proteïnes relacionades amb el mitocondri.

V.3. Efecte del tractament amb Fibra Soluble

A. INTRODUCCIÓ

El terme fibra va ser descrit el 1953 per Hispley i inclou la cel·lulosa, l'hemicel·lulosa i la lignina (Hispley, 1953 cita extreta de Mudgil & Barak ²¹⁶). No obstant, és important tenir en compte que la definició de fibra és complexa i està constantment en revisió. Actualment el Codex Alimentarius la defineix com polímers de carbohidrats amb deu o més unitats monomèriques, que no són hidrolitzats pels enzims endògens a l'intestí prim dels éssers humans ²¹⁷. L'American Association of Cereal Chemists, també inclou els oligosacàrids i defineix la fibra dietètica com les parts comestibles de les plantes o els carbohidrats anàlegs que resisteixen la digestió i l'absorció en l'intestí prim, amb fermentació completa o parcial a l'intestí gros ^{218 219}. L'EFSA la defineix com hidrats de carboni no digeribles, més lignina ²²⁰.

A més, la fibra es pot classificar en base a la solubilitat en aigua i per tant es pot dividir en fibra soluble que inclou pectina, gomes i polisacàrids solubles i en fibra insoluble que inclou cel·lulosa, hemicel·lulosa i lignina ²²¹. Tradicionalment es poden obtenir les fibres dietètiques a partir de cereals, llegums, fruites, hortalisses i patates. Els aliments rics en fibra poden contenir fibra soluble i insoluble en quantitats diferents ²²². També s'inclou el midó resistent, ja que resisteix la digestió de la glucosa a l'intestí prim humà i passa sense canvis a l'intestí gros ²²³.

S'ha estimat que en el Paleolític la ingesta de fibra era superior a 100 g per dia, mentre que la ingesta occidental actual és de només entre 10 i 20 g per dia. Les recomanacions actuals per a la ingesta de fibra estan relacionades amb l'edat, el sexe i el consum d'energia. La recomanació general per una ingesta adequada de fibra en els EUA és de 25 g/dia per a les dones i 38 g/dia per als homes ²²⁴. L'EFSA en base amb l'evidència disponible sobre la funció intestinal, considera una ingesta adequada de fibra de 25 g/dia ²²⁰.

Les fibres s'han estudiat àmpliament en els últims anys a causa dels seus efectes en salut i poden tenir un paper interessant en el tractament de la SM, per exemple un estudi en adolescents va observar una correlació inversa entre l'índex de fibra (g fibra/1000kcal) i la SM ²²⁵. En les últimes dècades s'ha reconegut que la fibra juga un paper important en una dieta saludable; els seus beneficis no estan en disputa i totes les fibres dietètiques es presumeixen que tenen un efecte fisiològic ^{218,226}.

Hi ha estudis que mostren que la fibra disminueix el risc per a la DM2, MCV i càncer de colon ^{221,227-232} mitjançant la reducció de la digestió i absorció dels macronutrients i disminuint el temps de contacte dels carcinògens dins de la llum intestinal ^{230,231,233,234}. A més, un gran nombre d'estudis en humans i en models experimentals han posat de manifest l'eficàcia de la fibra en la regulació del pes corporal, la ingesta d'aliment, l'homeòstasi de la glucosa, la sensibilitat a la insulina i altres factors de risc de MCV com ara el perfil de lípids en sèrum, la hipertensió i els marcadors inflamatoris sistèmics ²³⁵⁻²⁴³. Encara que els efectes hipocolesterolemians s'han trobat principalment en les fibres solubles ^{216,230,244-247}.

Com es pot observar son molts els estudis relacionats amb la fibra, però aquesta introducció es centrarà en els estudis duts a terme en base a la RI, ja que és l'objectiu principal de la tesi.

1. FIBRA I RESISTÈNCIA A LA INSULINA

Hi ha moltes investigacions que han examinat la relació entre el consum de fibra i la sensibilitat a la insulina ²⁴⁸⁻²⁵⁸. La majoria d'estudis es basen en el total de fibra consumida ^{248,251,252,254,255,257,258}. Però és d'especial importància tenir en compte que hi ha dos categories de fibres en relació a la seva solubilitat com s'ha comentat anteriorment, soluble i insoluble, i que aquestes tenen efectes molt diferents d'absorció i digestió. Per exemple hi ha un article que va revelar una associació inversa significativa entre el consum de fibra soluble i la RI en dones no diabètiques de mitjana edat ²⁵⁹. A més, van observar que el consum de fibra insoluble no va ser un predictor significatiu de la RI ²⁵⁹. S'ha estudiat que el consum de fibra soluble pot retardar el buidament gàstric i la disminució de l'absorció dels macronutrients, la qual cosa redueix la glucèmia postprandial i el nivell d'insulina ²³¹. Altres estudis indiquen que els augments moderats en la ingesta de fibra dels aliments o suplementes s'associen amb una reducció significativa en els valors d'insulina en dejú, de glucosa en plasma i l'augment de la sensibilitat a la insulina en subjectes no diabètics ²⁶⁰⁻²⁶³. Per a diabètics, també es va documentar una millora del control de glucèmia i una millora de la sensibilitat a la insulina amb suplementes de fibra ^{246,264,265}.

El sobrepès i l'obesitat són factors de risc de la RI i s'ha establert una forta relació inversa entre la ingesta de fibra dietètica i el pes en models animals ²⁶⁶⁻²⁷¹ i estudis epidemiològics en humans ²⁷²⁻²⁷⁵. L'efecte protector de la fibra en l'obesitat i la

RI ha estat històricament atribuït a una major sacietat a causa d'un augment de la masticació, del desplaçament de calories, els pèptids de sacietat que incrementen la insulina i la disminució de l'absorció de macronutrients ²⁷⁶. Aquest mecanisme es creu que és per raó de la capacitat de les fibres solubles per formar solucions viscoses que alenteix el temps de buidatge gàstric, digestió dels aliments i absorció i en conseqüència inhibeixen el transport de glucosa, els TG i el colesterol a través de l'intestí ^{234,277-282}.

Respecte el mecanisme de la fibra en el tracte intestinal, destacar que pot afectar la secreció d'hormones intestinals o pèptids, com ara la colecistoquinina o el pèptid similar al glucagó-1 (GLP-1), independent de la resposta glucèmica, que poden actuar com a factors de sacietat o alterar l'homeòstasi de la glucosa ²⁸³. Alguns estudis han mostrat augments prolongats de la colecistoquinina circulants després de la ingestió de menjars rics en fibra en relació amb àpats baixos en fibra ^{284,285}. La colecistoquinina és secretada a partir de cèl·lules a l'intestí prim en la ingestió d'aliments, i té funcions en l'estimulació de la secreció pancreàtica, la regulació del buidatge gàstric i la inducció de la sacietat central ²⁸⁶. Experiments en rates han demostrat que l'efecte saciant de fibres solubles, com ara l'oligofructosa i altres fructans s'ha associat amb un augment important en la circulació de pèptids intestinals anorexígens com ara GLP-1 i el pèptid YY, així com amb una reducció en els nivells de grelina en sèrum ²⁸⁷. El pèptid GLP-1 és una hormona secretada per les cèl·lules L intestinals en resposta a la glucosa i altres nutrients ingerits i indueix la secreció d'insulina. Per tant, GLP-1 juga un paper interessant en el control de la gana i la ingesta d'aliments i, en conseqüència, en la regulació del pes corporal.

2. FIBRA I FERMENTACIÓ COLÒNICA

A més del descrit anteriorment, s'està estudiant com els productes de fermentació de la microflora del còlon com els àcids grassos de cadena curta (AGCC) (acetat, propiònic i butíric) tenen un paper fisiològic clau en la prevenció de la SM ja que poden influir en la sacietat, sensibilitat a la insulina i la ingesta d'energia, la formació d'AGL i la secreció d'hormones i molècules de senyalització cel·lular presents en el còlon ^{276,288}.

Un estudi en rates va mostrar una correlació entre les concentracions d'àcid propiònic i butíric en el contingut cecal i portal i a la sang aòrtica, indicant a més, que

l'avaluació d'AGCC a la sang venosa de diferents fibres dietètiques en rates és representatiu dels perfils formats en el cec i el còlon ²⁸⁹. També s'ha demostrat que la concentració plasmàtica d'àcid butíric augmenta després de la ingesta de fibra ²⁹⁰.

Dels diferents AGCC, l'àcid butíric és el que s'ha emfatitzat més. És la font més important d'energia per a les cèl·lules epitelials del còlon ²⁹¹, però també està involucrat en el metabolisme dels lípids i alenteix el transport del greix des de l'intestí ^{292,293}. En relació amb el butirat, un article publicat per Gao et al ²⁹⁴ conclou que la suplementació dietètica amb butirat pot prevenir i tractar la RI induïda per la dieta en ratolins. El mecanisme d'acció del butirat està relacionat amb la promoció de la despesa energètica i la inducció de la funció mitocondrial, ja que s'evidencia l'activitat termogènica de l'àcid butíric en un model de SM. Per tant, les dades d'aquest estudi suggereixen que el butirat és eficaç en el tractament de l'obesitat i la RI en un model d'obesitat dietètica. La inducció de l'activitat de PGC-1 α pot ser un mecanisme molecular pel qual el butirat estimula la funció mitocondrial. A més, hi ha estudis que indiquen que l'àcid butíric està involucrat en el metabolisme dels lípids ^{292,293} i que millora els nivells de glucosa en sang ²⁹⁰. Respecte l'AMPK, en un article hipotetitzen que el principal mecanisme subjacent de l'efecte beneficiós d'una dieta alta en fibra en la SM és l'augment de la producció d'AGCC que condueix a una major concentració d'AGCC a la vena porta, els quals activen l'AMPK en el fetge ²⁹⁵.

Per tant, en aquest sentit, es vol estudiar si hi ha una relació entre la RI i una influència de la fibra en el mitocondri que hipotèticament es podrien dur a terme per efectes indirectes de la ingesta de fibra com ara l'absorció de productes de fermentació colònica i/o els canvis induïts al metabolisme per la restricció en l'absorció de nutrients i a la senyalització d'hormones de sacietat.

B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB FIBRA SOLUBLE EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC

A continuació es mostraran els resultats obtinguts de l'estudi dels ratolins amb una disminució de la sensibilitat a la insulina alimentats amb una dieta normocalòrica, dieta hipercalòrica i la seva combinació amb l'addició de fibra soluble. En la Taula 9 es mostra la quantitat de fibra insoluble i soluble de les dietes. Les dietes NC+F i HC+F mostren el doble de quantitat de fibra provinent de l'addició de cutícules de llavors de *Plantago Ovata*. Per tant, l'efecte observat en aquests grups serà per la fibra soluble

afegida. També és important mencionar que les dietes amb l'addició de fibra soluble mostren una restricció energètica del 6%.

Taula 9. Quantitat de fibra insoluble i soluble en les dietes.

Fibra	NC	HC	NC+F*	HC+F*
g/kg dieta	58	58	116	116
g/kg Insoluble	58	58	58	58
g/kg Soluble			58	58

*La fibra soluble és aportada per l'addició de cutícules de llavors de Plantago Ovata a la dieta.

1. INGESTA, PES I PARÀMETRES BIOQUÍMICS

Durant els dos mesos de tractament es va fer un seguiment setmanal del consum alimentari i del pes corporal i al finalitzar el tractament es va obtenir plasma per l'anàlisi del perfil lipídic. En la Figura 51 es mostra l'evolució del pes durant els dos mesos de tractament. El grup NC+F té una disminució de pes més marcada que el grup NC. No obstant, la disminució de pes més pronunciada que s'observa a l'inici de l'estudi es va estabilitzant a les tres setmanes de tractament. En el context de dieta hipercalòrica, els dos grups augmenten de pes, tot i que el grup amb l'addició de fibra soluble aquest augment és menor. Per tant, la fibra soluble té un valor afegit en el canvi de pes corporal, a més s'ha de tenir en compte que les dietes amb l'addició de fibra soluble presentaven un 6% menys de valor calòric.

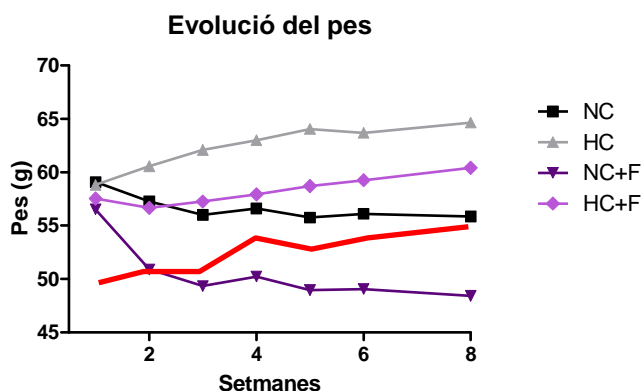


Figura 51. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb fibra soluble. La línia roja indica l'evolució del pes del Control.

Respecte el consum alimentari, en la Taula 10, s'observa que els dos grups que van ingerir una dieta normocalòrica disminueixen de pes, sent aquesta disminució més

pronunciada en el grup NC+F. En canvi, hi ha un augment de pes en els dos grups amb dieta hipercalòrica, encara que l'augment és menor en el grup al qual se li va afegir fibra soluble, tal i com ja s'ha descrit en estudis anteriors en models animals ^{266,271}. Per tant, la fibra soluble té un valor afegit en el canvi de pes corporal. Respecte el consum d'aliment no s'observen diferències significatives entre grups. Solament s'observa una tendència a disminuir el consum en els grups amb una ingesta hipercalòrica, tot i que al normalitzar-ho amb les calories s'observa un augment del consum energètic.

Taula 10. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

	NC	HC	NC+F	HC+F
Pes inicial (g)	59,1±9,3	58,8±8,7	56,5±7,9	57,5±5,9
Pes final (g)	55,9±8,0	64,7±9,8	48,4±6,0 ^{b*}	60,4±8,2
Guany pes corporal (g)	-3,2±2,5	5,8±1,4 ^{a**}	-8,1±4,8 ^{b***}	2,9±3,1 ^{a*, c***}
Consum d'aliment (g dieta setmana/g de pes animal)	0,55±0,06	0,47±0,11	0,55±0,04	0,47±0,05
Consum energètic (kcal setmana/g de pes animal)	2,13±0,23	2,79±0,67 ^{a*}	2,14±0,16 ^{b*}	2,8±0,29 ^{a*c*}
Colesterol total (mg/dL)	188,6±55,5	239,0±60,7	135,3±20,22 ^{b**}	159,8±22,66 ^{b*}
HDL (mg/dL)	106,1±24,1	117,5±23,4	100,5±11,58	105,9±13,18
LDL (mg/dL)	114,8±38,2	104,1±25,3	83,26±22,21	90,17±9,175
TG (mg/dL)	74,5±16,6	63,2±20,3	68,0±14,93	85,82±7,723
HDL/Col. Total	0,58±0,09	0,53±0,09	0,75±0,04 ^{a** b***}	0,67±0,09 ^{b*}
HDL/LDL	1,18±0,48	1,16±0,27	1,26±0,28	1,19±0,2

S'observen diferències estadísticament significatives en el pes corporal, el consum dietari i en el perfil lipídic entre els grups. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (*p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 a amb respecte a NC, b amb respecte a HC, c comparant NC+F i HC+F). Les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL s'han calculat en base als resultats individuals.

En l'estudi del perfil lipídic (Taula 10), s'observa una disminució significativa del colesterol total en els dos grups que van ingerir fibra soluble respecte al grup amb una dieta hipercalòrica. No s'observen diferències entre els grups NC i NC+F, encara que hi ha una tendència a disminuir els nivells de colesterol en el grup NC+F. En els altres paràmetres no es veuen diferències significatives entre els grups, tot i que en LDL hi ha una tendència a disminuir els nivells en els dos grups que van ingerir fibra soluble. No obstant això, quan es fa una relació entre HDL i Colesterol total i LDL s'observa un augment significatiu en els dos grups amb una addició de fibra soluble en la relació

HDL/Col. total, sent aquesta relació favorable en el perfil lipídic. Respecte els TG, encara que la diferència no és significativa el grup HC+F tendeix a augmentar els nivells respecte els altres grups.

Després del sacrifici es va extreure el contingut cecal dels ratolins i es va recol·lectar la femta per poder estudiar el contingut de carbohidrats present en aquestes mostres. En la Figura 52 s'observa que tant en el contingut cecal com en la femta el contingut de carbohidrats és significativament major en els grups amb una ingesta de fibra soluble, sent aquests valors majors en el grup NC+F. Per tant, aquests canvis en els nivells de carbohidrats en la femta i contingut cecal s'atribueixen al contingut de fibra soluble afegida a la dieta i possiblement a les propietats de la fibra soluble d'augmentar la viscositat del contingut intestinal i consegüentment la disminució de l'absorció de carbohidrats a l'intestí.

Tot i que el contingut de fibra era dos vegades superior en el grup amb una ingesta de fibra soluble, s'observa que el contingut de carbohidrats en el contingut cecal és 4 i 2,5 vegades major en el grup NC+F i HC+F respectivament. Respecte al contingut de carbohidrats en la femta, es continua observant 4 vegades més en el grup NC+F respecte NC, però en el cas del grup HC+F en la femta l'augment és de 4 vegades més, a causa de que el grup HC disminueix el contingut de carbohidrats en la femta en comparació amb el contingut cecal. Per tant, es suggereix cert efecte inhibitori d'absorció de carbohidrats, tot i que és difícil de determinar el tipus dels carbohidrats.

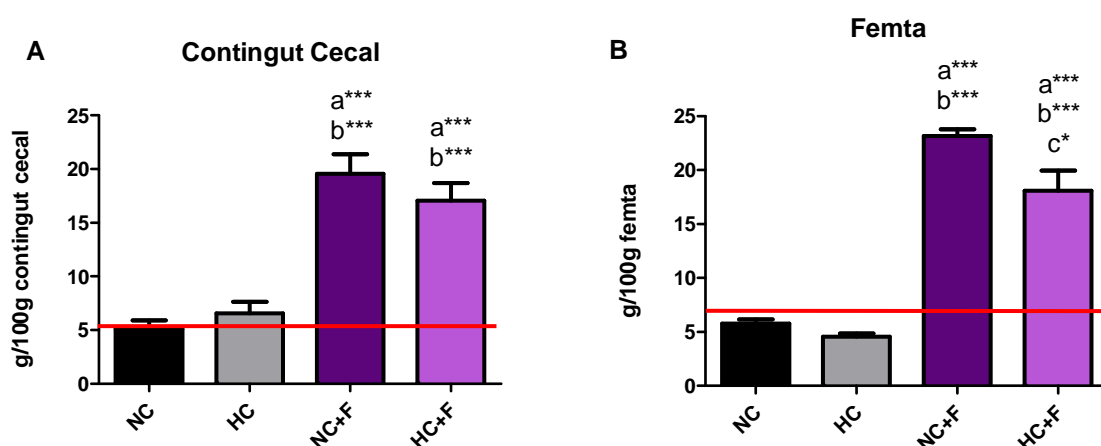


Figura 52. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Nivells de carbohidrats (g/100g) en el contingut cecal (A) i en la femta (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ *** $p < 0.01$ ** $p < 0.001$). a amb respecte a NC, b amb respecte a HC, c comparant NC+F i HC+F).

Un cop analitzats els canvis que s'han produït en la ingesta, pes i perfil lipídic, es vol observar si tal i com es demostra en la bibliografia, la fibra soluble influeix en la sensibilitat a la insulina.

2. SENSIBILITAT A LA INSULINA

Per determinar la sensibilitat a la insulina, es va realitzar una corba de tolerància a la glucosa, una corba de resposta glucèmica a la insulina i s'avaluarà la fructosamina, GLUT4, GLUT2 i AMPK α .

Com s'observa en la Figura 53 els dos grups amb una ingesta de fibra soluble augmenten la tolerància subcutània a la glucosa, mostrant a més uns nivells de glucosa semblants que el grup Control (línia roja). No s'observen diferències significatives entre els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, per tant, la fibra soluble millora la tolerància a la glucosa d'una dieta normocalòrica i prevé el deteriorament produït per una alimentació rica en greixos.

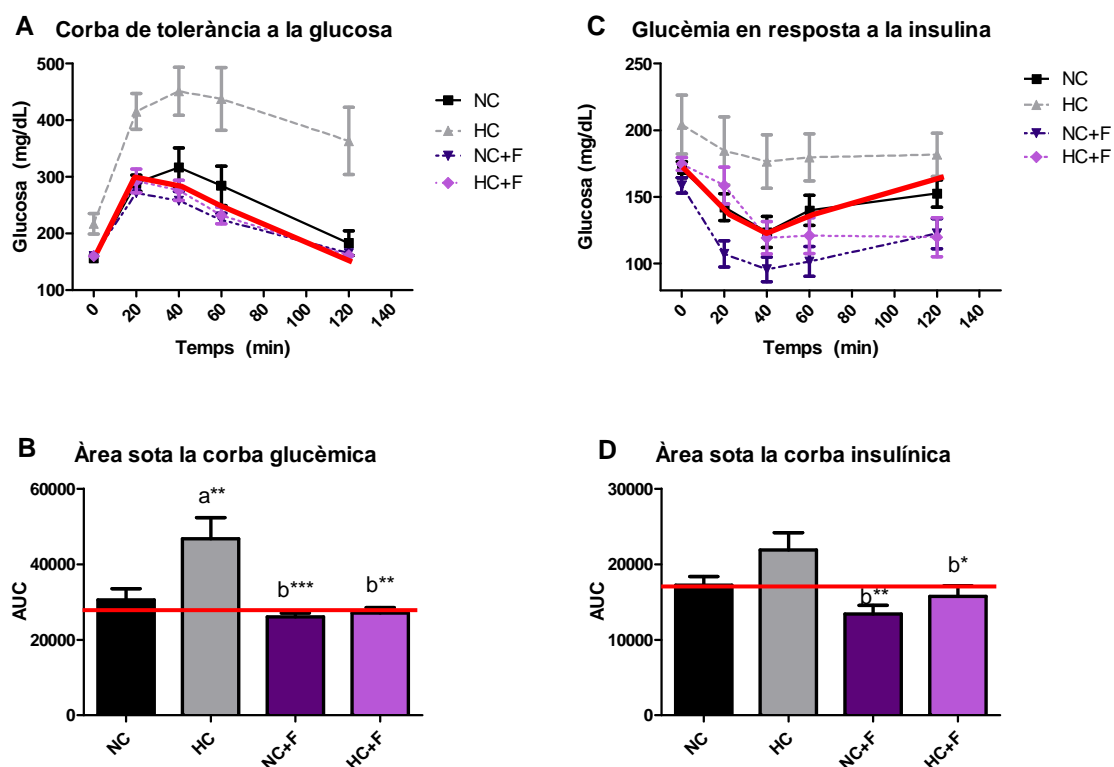


Figura 53. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Corba de tolerància a la glucosa i la seva corresponent àrea sota la corba (A) i Resposta glucèmica a la insulina i la seva corresponent àrea sota la corba (B). La línia roja indica el Control. En la corba de tolerància a la glucosa (A) s'observen diferències en tots els punts de la corba. Al minut 0 hi ha diferències en els grups NC+F i HC+F respecte HC ($p < 0.01$). Al minut 20, 40 i 60 en els grups NC+F i HC+F respecte HC ($p < 0.001$ i $p < 0.01$ respectivament). Al minut 120 hi ha diferències en els grups NC+F i HC+F respecte HC ($p < 0.001$). En la glucèmia en resposta a la insulina (C) s'observen diferències significatives en tots els punts de la corba en el grup NC+F respecte HC ($p < 0.05$ en els punts 0, 20 i 120, $p < 0.01$ en els punts 40 i 60) i en el minuts 40, 60 i 120 en el grup HC+F respecte HC ($p < 0.05$). Les diferències entre NC i HC de la Figura 53A i 53C es comparen en la Figura 7. Els valors marcats en la Figura 53B i 53D mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

Respecte al test de resposta glucèmica a la insulina (Figura 53C), s'observa com els grups que van ingerir fibra soluble milloren la resposta a la insulina respecte els grups que no van tenir una addició de fibra soluble. En aquest sentit, hi ha un augment de la sensibilitat a la insulina en aquests grups.

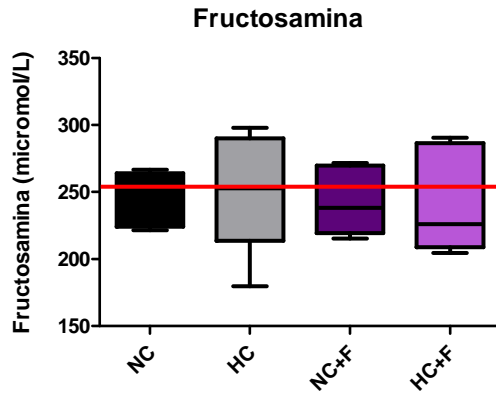


Figura 54. Fructosamina en plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Fructosamina (micromol/L) en plasma. La línia roja indica el Control. No s'observen diferències entre grups.

Com a prova complementària de la sensibilitat a la insulina, es va mesurar la concentració de fructosamina (Figura 54). En els diferents grups no s'observen diferències significatives en els nivells de fructosamina tot i les diferències observades en la corba de glucosa entre els diferents grups.

Respecte el GLUT4, en la Figura 55 s'observa un augment en el grup NC+F tant en el múscul com en el teixit adipós, mentre que el grup HC+F retorna als nivells del Control a diferència del grup HC. Per tant, es relaciona aquest augment del transportador amb l'augment de la sensibilitat a la insulina. A diferència de la corba de glucosa que no s'observen canvis entre els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, en aquest cas el grup HC+F presenta uns nivells menors respecte el grup NC+F. Respecte GLUT2 no s'observen diferències significatives entre els grups, tot i que els dos grups amb l'addició de fibra soluble tendeixen a retornar a uns nivells com el Control.

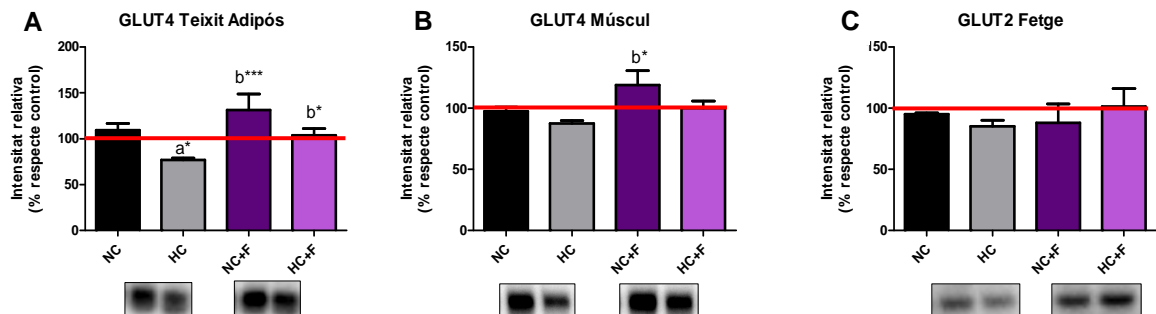


Figura 55. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Quantificació per densitometria de GLUT4 en múscul (A) i teixit adipós (B) i de GLUT2 en fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$). a amb respecte a NC, b amb respecte HC).

En relació amb els nivells d'AMPK α (Figura 56), en el múscul i en el fetge els dos grups amb una ingesta de fibra soluble presenten uns nivells superiors al Control. En el teixit adipós hi ha una recuperació dels nivells respecte el Control. Per tant, hi ha una normalització o augment de l'AMPK α que s'atribueix a la ingesta de fibra soluble.

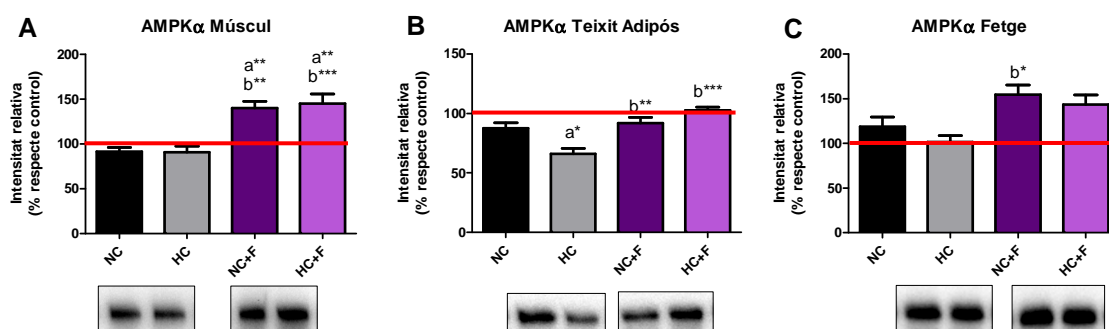


Figura 56. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació d'AMPK α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a NC i b amb respecte HC).

Aquests resultats observats en l'AMPK α van en relació amb els nivells de GLUT4 i amb la corba de tolerància a la glucosa. A més, hi ha un estudi en que rates alimentades amb fibra viscosa tenien una major activació d'AMPK α en el fetge i en el múscul ²⁹⁶. En relació amb això, hi ha un estudi que indica que els augments dels AGCC a causa de la fermentació bacteriana de la fibra poden activar l'AMPK α hepàtica ²⁹⁵.

Les dades presentades fins ara indiquen que la ingesta de fibra soluble s'associa significativament a una millora del metabolisme glucídic i a la sensibilitat a la insulina independentment del tipus de dieta. Per exemple, un estudi realitzat amb adolescents van indicar que la ingesta de fibra dietètica es va associar amb unes probabilitats més baixes de SM ²²⁵.

També és important senyalar que la ingesta de fibra ha estat un dels principals focus d'estudi en la reducció de la RI. Aquesta reducció de la RI s'atribueix als efectes hormonals, intrínsecs i en el colon produïts per la fibra amb la consegüent pèrdua de pes. En aquest capítol, els canvis observats en la sensibilitat a la insulina poden estar relacionats amb la pèrdua de pes. No obstant, de forma addicional a l'efecte de la fibra en la RI i en la reducció de la captació energètica, a continuació es vol observar si la ingesta de fibra soluble provoca canvis en el mitocondri i si a diferència del

metabolisme glucídic hi ha canvis entre els dos tipus de dieta amb l'addició de fibra soluble. A més, tot i l'escassetat d'estudis respecte la fibra i el mitocondri hi ha dades que suggereixen que els mecanismes pels quals la fibra millora la sensibilitat a la insulina poden convergir en el mitocondri, per exemple en un estudi van indicar que la fibra soluble preserva la massa corporal magra i redueix l'adipositat, possiblement per un augment de la biogènesi mitocondrial i l'oxidació d'àcids grassos en el múscul esquelètic²⁹⁶ o en un altre estudi van concloure que el butirat (producte de fermentació per la microflora del colon) induïx l'activitat de PGC-1 α i per tant pot estimular la funció mitocondrial²⁹⁴.

3. CANVIS EN L'ADNmt i PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI

3.1. ADNmt

Quan s'avalua el nombre mitocondrial per l'avaluació de la relació ADNmt i ADN nuclear (Figura 57), s'observa un augment significatiu en el múscul del grup HC+F respecte NC i HC i una tendència a l'augment en el grup NC+F. En el teixit adipós no s'observen diferències significatives entre grups. Contràriament al teixit muscular, en el fetge hi ha una disminució en la quantitat de mitocondris en els dos grups amb una ingesta de fibra, sent la diferència major en el grup HC+F. En aquest sentit, a continuació es pot observar com la ingesta de fibra soluble promou un augment dels mitocondris en el múscul però una disminució en el fetge.

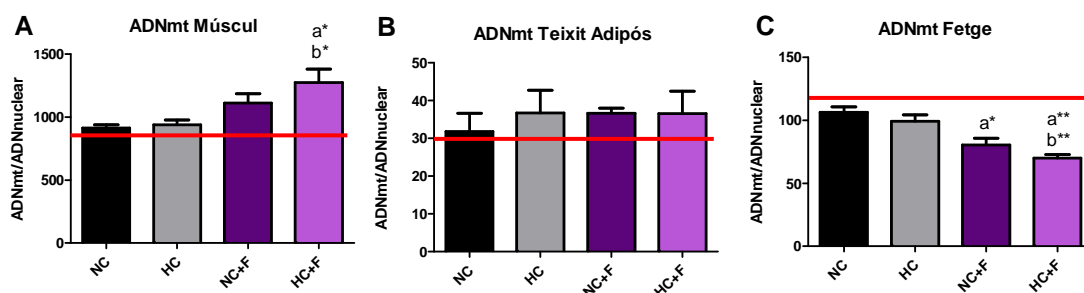


Figura 57. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Avaluació de l'ADNmt en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant el marcador Cytb i es normalitza i es determina segons l'amplificació del gen Actb utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta Ct}$). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte Control, b amb respecte HC i c comparant NC+F i HC+F).

3.2. PORINA

En quan a la porina (Figura 58), s'observa un augment significatiu en el múscul dels grups NC+F i HC+F respecte els seus controls, sent aquesta diferència major en el grup HC+F. Aquest fet es podria relacionar amb l'augment de l'ADNmt en aquests grups. En el teixit adipós s'observa com hi ha una diferència entre el grup NC+F i HC+F, sent el valor d'aquest últim grup més elevat. En el fetge, tot i la disminució de l'ADNmt en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, s'observa uns valors majors que el Control, tot i que les diferències no son significatives. Quan s'igualava la porina amb l'ADNmt s'observen les mateixes diferències entre grups a diferència del fetge on hi ha un augment significatiu en els grups amb l'addició de fibra soluble respecte el grup HC. Els increments de la porina en els dos grups amb una ingesta de fibra en el múscul, podria ser a causa d'un major flux de substrats que condueixi a una major taxa de metabolització energètica.

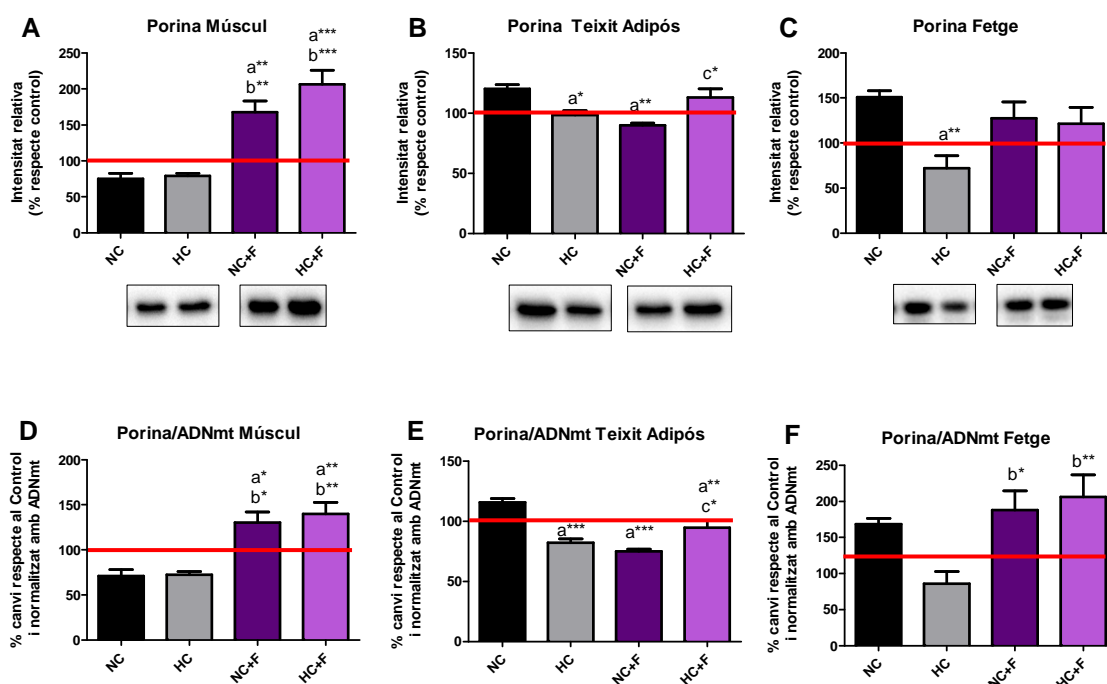


Figura 58. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació de la porina per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) i normalitzada amb l'ADNmt en el múscul (D), teixit adipós (E) i fetge (F). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$ ^a amb respecte NC, ^b amb respecte HC i ^c comparant NC+F i HC+F).

3.3. CANVIS EN ELS COMPLEXOS MITOCONDRIALS

Per estudiar si hi ha una alteració en la capacitat funcional del mitocondri amb la ingesta de fibra soluble i a més per relacionar l'augment de la quantitat de

mitocondris en el múscul i la disminució en el fetge, es va avaluar el contingut de proteïnes de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, així com proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial i en la morfologia dels mitocondris en el múscul, teixit adipós i fetge dels ratolins.

3.3.1. Complexos mitocondrials en el múscul

En la Figura 59 s'observa un augment significatiu en els complexos I, III i IV en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, en el complex II també s'observa un augment en els dos grups, tot i que aquest augment no és significatiu.

Quan s'igualen els complexos amb l'ADNmt es continua observant un augment significatiu en els complexos I i IV. Per tant, l'addició de fibra soluble independentment del tipus de dieta, produeix uns canvis en la cadena de transport d'electrons al múscul.

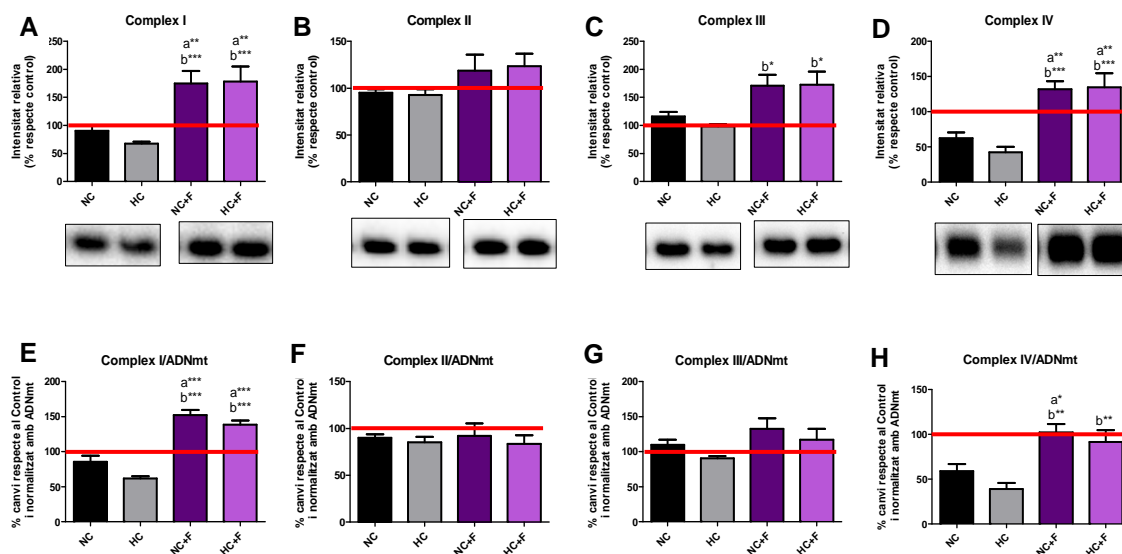


Figura 59. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit muscular (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte Control, b amb respecte HC).

3.3.2. Complexos mitocondrials en el teixit adipós

En la Figura 60 es representen els resultats dels complexos en el teixit adipós. S'observa com en el complex I hi ha una tendència a l'augment en els grups amb una ingesta de fibra soluble.

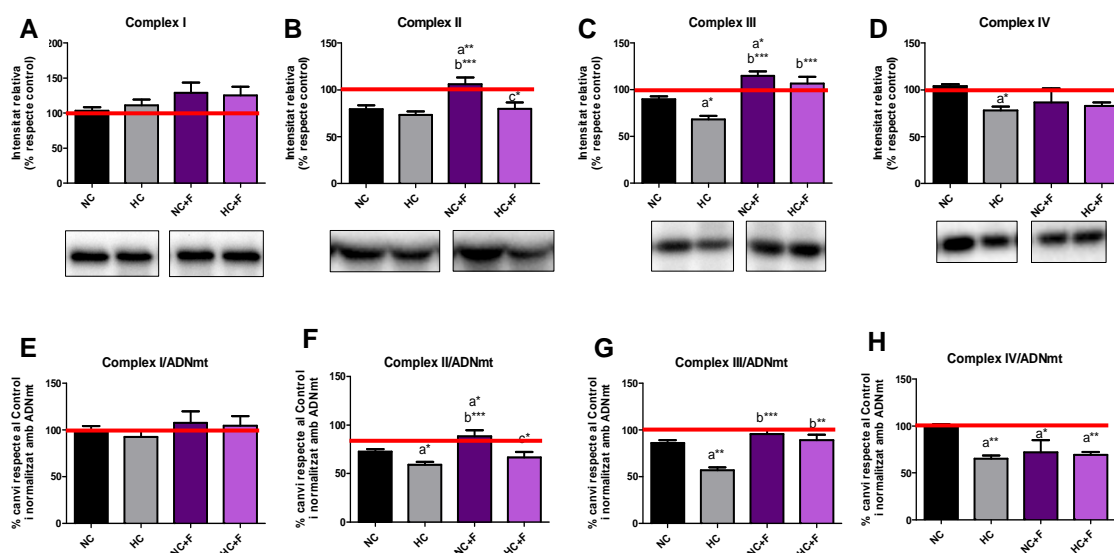


Figura 60. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit adipós (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$). a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+F i HC+F).

En canvi, en el complex II solament hi ha un augment significatiu respecte els altres grups en el grup NC+F. Respecte el complex III, els dos grups amb fibra soluble tenen un augment respecte els altres grups, retornant als nivells el Control. Finalment, en el complex IV no s'observen canvis significatius en els grups amb fibra soluble. Quan s'iguen els complexos amb l'ADNmt segueix havent el mateix patró que els complexos, ja que la quantitat de mitocondris en aquest teixit no difereix entre grups.

3.3.3. Complexos mitocondrials en el fetge

Respecte el teixit hepàtic (Figura 61) no s'observen diferències significatives entre grups en els complexos, a diferència del complex IV on el grup NC+F mostra un augment similar que el grup NC. El grup HC+F mostra una tendència cap a l'augment respecte HC i retornant als nivells del Control.

Quan s'iguen els complexos respecte l'ADNmt s'observa un augment significatiu en els complexos II i IV i també encara que no hi ha diferència significativa en els complexos I i III s'observa una tendència cap a l'augment. Aquest canvi en la quantitat de complexos respecte l'ADNmt es deu a que el fetge té una quantitat menor de mitocondris. Per tant, tot i la disminució de l'ADNmt, sembla ser que aquests mitocondris presenten més quantitat de complexos per mitocondri.

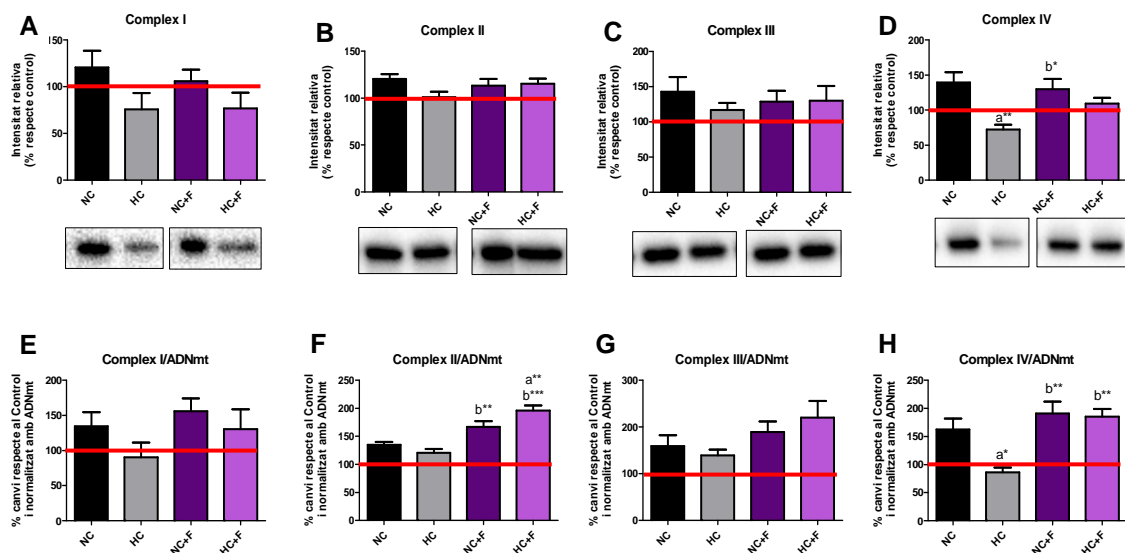


Figura 61. Quantificació dels complexos mitocondrials després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el fetge (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ a $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ ***). a amb respecte Control, b amb respecte HC i c comparant NC+OP i HC+OP).

En general, s'observa que el tractament amb fibra soluble produeix un increment en el nombre de mitocondris en el múscul. Els quals, presenten una major proporció de porina i complexos mitocondrials. Aquests canvis poden estar relacionats amb una major taxa de metabolització energètica i ser la conseqüència de la disminució de pes observada en els dos grups. Respecte al teixit adipós i hepàtic, encara que no s'han observat canvis en la massa mitocondrial, si s'observa una major densitat de porina i complexos mitocondrials. Ara bé, es vol observar si aquests canvis estan relacionats amb diverses proteïnes involucrades en la biogènesi mitocondrial.

3.4. SIRT1

En la Figura 62 es pot observar en el múscul un augment significatiu de SIRT1 en els grups NC+F i HC+F retornant als nivells normals del Control. En el teixit adipós hi ha un augment significatiu en el grup NC+F respecte NC i HC i en el grup HC+F respecte HC. En canvi, en el fetge no s'observen diferències significatives entre grups. Per tant, la ingesta de fibra soluble en el múscul i teixit adipós millora els nivells de SIRT1.

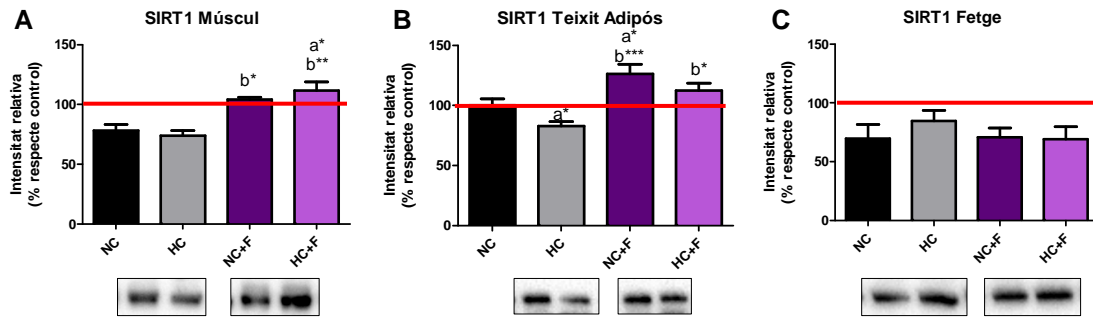


Figura 62. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació de SIRT1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències entre els grups ($p < 0.05$ ^{*} $p < 0.01$ ^{**} $p < 0.001$ ^{***} a amb respecte NC, b amb respecte HC).

3.5. PGC-1 α

En la Figura 63 s'observa una tendència cap a l'augment en els grups amb una ingesta de fibra soluble en el múscul i un augment significatiu en el teixit adipós, sent aquests valors majors que el grup Control. En canvi, en el fetge no s'observen diferències significatives entre grups.

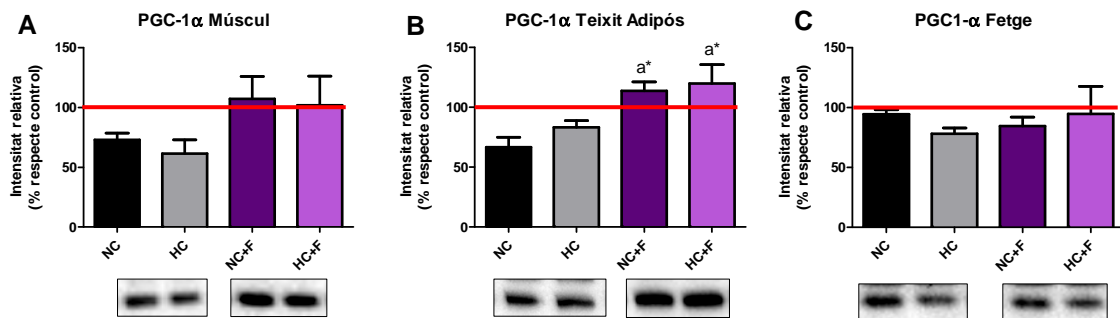


Figura 63. Quantificació de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació de PGC-1 α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferència significativa entre els grups ($p < 0.05$ ^{*} a amb respecte NC).

3.6. MFN2

En la Figura 64 s'observa en el múscul una tendència cap a l'augment de MFN2 en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble respecte els altres dos grups. En el teixit adipós hi ha un augment respecte el grup HC en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, retornant així als nivells del Control. Finalment en el fetge s'observa un augment del grup NC+F igual que el grup NC i el grup HC+F tendeix a

augmentar respecte el grup HC. Per tant, la fibra soluble en el grup HC+F mostra un efecte en el contingut de MFN2.

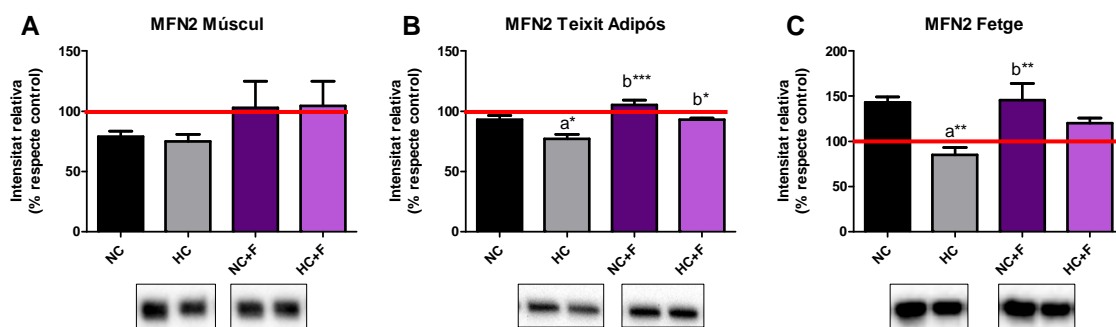


Figura 64. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació de MFN2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.001$ *** $p < 0.001$). a amb respecte a NC, b amb respecte a HC).

Per tant, en relació amb aquests resultats i tot i l'escassetat de dades al respecte, es podria suggerir que hi ha un augment de la biogènesi mitocondrial en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble. Aquest fet el recolza l'augment de l'ADNmt, juntament amb un augment de les proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial com l'AMPK α , PGC-1 α , SIRT1, porina i complexos mitocondrials.

3.7. BCL2

S'observa en la Figura 65 una disminució en el múscul en els grups amb una ingesta de fibra soluble respecte el grup NC, tot i que els nivells són els mateixos que el grup Control (línia roja). En el teixit adipós no s'observen diferències entre els grups, sent els valors iguals que el grup Control. En el fetge, encara que no hi ha diferències significatives entre els grups, els grups amb una dieta normocalòrica tendeixen a augmentar els nivells de BCL2.

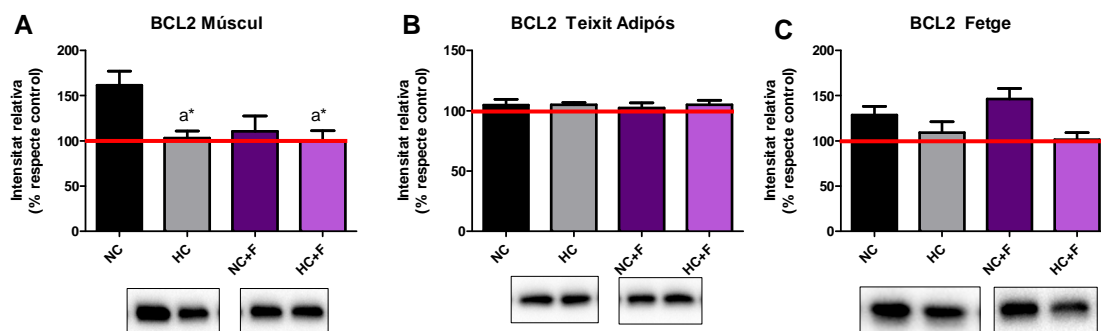


Figura 65. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Quantificació de BCL2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ a amb respecte NC).

4. DANY OXIDATIU

4.1. DANY OXIDATIU PROTEIC DIRECTE

En la Figura 66 s'observa un augment significatiu en el múscul del marcador SAG en el grup NC+F respecte els altres grups. En el teixit adipós hi ha un augment del dany en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble i en el fetge no s'observen diferències entre grups.

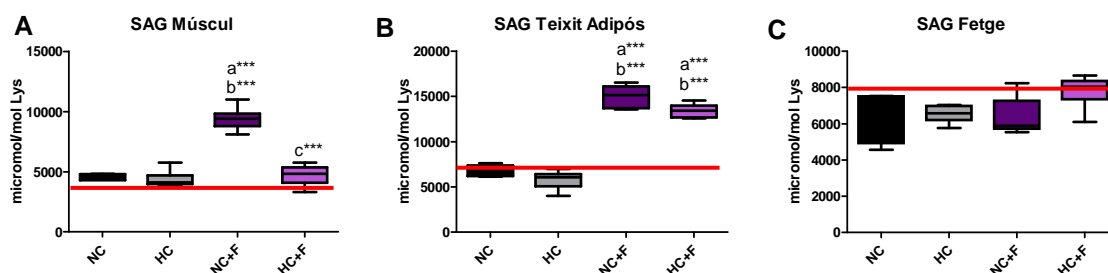


Figura 66. Nivells de semialdehid glutàmic (SAG) després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Nivells de SAG (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (*** $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+F i HC+F).

4.2. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICOXIDACIÓ

No s'observen diferències significatives entre grups en el múscul i en el fetge en els nivells del marcador CEL (Figura 67), en canvi en el teixit adipós hi ha un augment significatiu en el grup HC+F respecte HC.

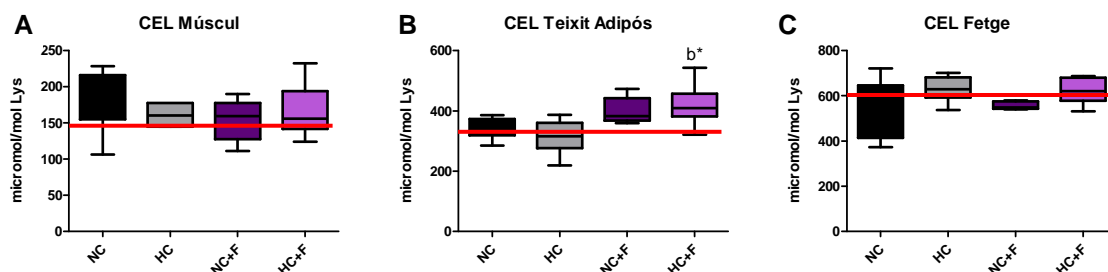


Figura 67. Nivells de Nε-(Carboxietil)lisina (CEL) després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Nivells de CEL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ b amb respecte HC).

4.3. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LIPOXIDACIÓ

El marcador MDAL es veu significativament augmentat en el grup NC+F respecte NC i HC en el teixit muscular (Figura 68A). En canvi, en el teixit adipós hi ha una disminució en les dos dietes que han ingerit una dieta hipercalòrica respecte a les dietes normocalòriques (Figura 68B). En el fetge no s'observen diferències significatives entre els grups (Figura 68C).

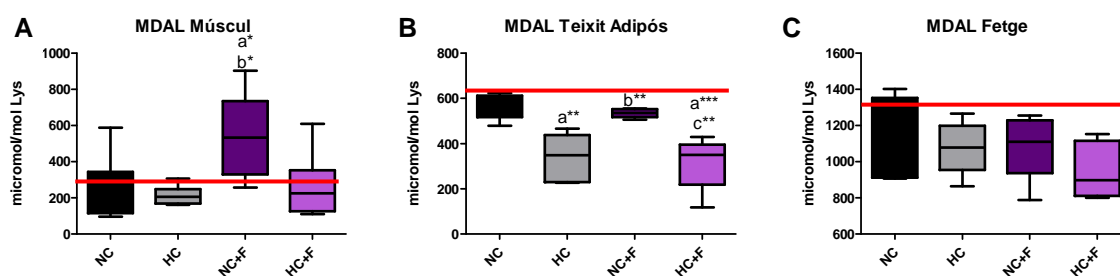


Figura 68. Nivells de malondialdehid-lisina (MDAL) després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Nivells de MDAL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+F i HC+F).

4.4. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICO I LIPOXIDACIÓ

En la Figura 69 s'observa en el múscul un augment en els nivells de CML en el grup HC+F respecte NC+F. En el fetge i teixit adipós hi ha un augment significatiu en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble respecte els altres dos grups. Per tant, la ingesta de fibra soluble influeix en l'augment d'aquest marcador en el teixit adipós i fetge.

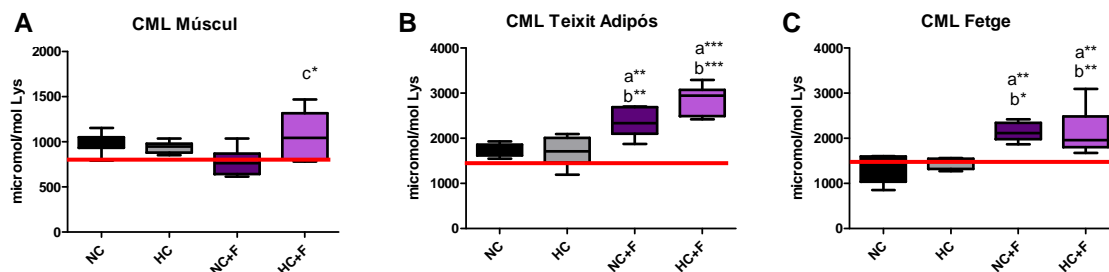


Figura 69. Nivells de Nε-(carboximetil)lisina (CML) després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Nivells de CML (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+F i HC+F).

4.5. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LA REACCIÓ DEL FUMARAT AMB LA CISTEÏNA

S'ha utilitzat el marcador 2-Succinyl-Cysteine (2SC), que deriva de la reacció del fumarat (del cicle de Krebs) amb la cisteïna. El 2SC pot ser un biomarcador útil de l'estrès mitocondrial a la diabetis ¹³⁸. En la Figura 70 no s'observen diferències entre els grups en els diferents teixits i per tant no s'observa un dany al mitocondri en base a aquest marcador.

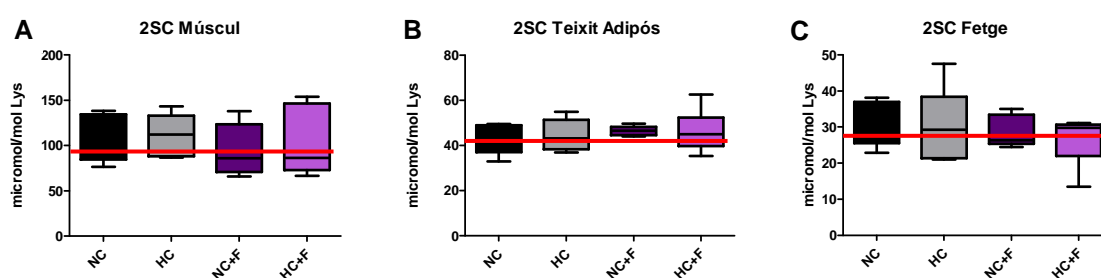


Figura 70. Nivells de 2-succinyl-cysteine (2SC) després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Nivells de 2SC (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. No s'observen diferències significatives entre grups i teixits.

4.6. ENZIM ANTIOXIDANT SOD1

En la Figura 71 s'observa un augment significatiu en el grup NC+F respecte el grup HC en el múscul. En el teixit adipós hi ha un augment significatiu dels nivells de SOD1 en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble. Aquest augment es podria relacionar amb l'augment del dany oxidatiu en aquest teixit en alguns marcadors. Respecte el fetge no s'observen diferències significatives entre els grups.

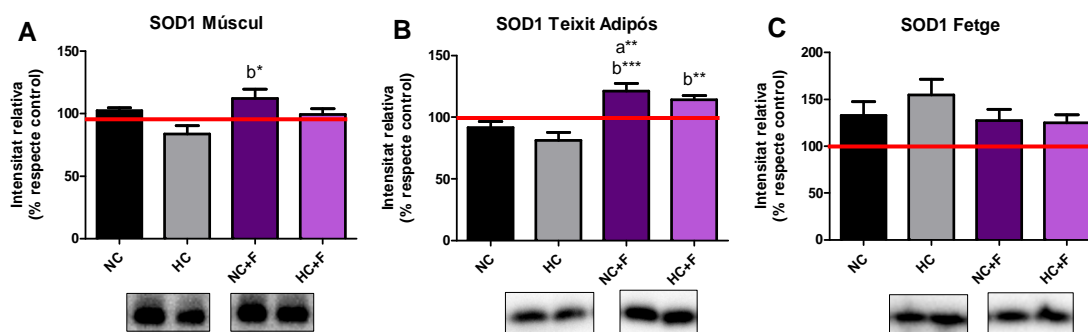


Figura 71. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb fibra soluble. Quantificació de SOD1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

En general s'observa un augment del dany oxidatiu a la majoria de marcadors, sobretot en el teixit muscular i adipós en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble. Per tant, es podria atribuir l'augment de la SOD1 que s'observa en el múscul i teixit adipós a l'increment en el dany oxidatiu. Probablement, aquest major dany observat sigui per la major sensibilitat a la insulina i consegüent metabolització de l'energia.

5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA

En la Figura 72A s'observa una tendència a l'augment dels nivells de FRAP en el grup NC+F respecte el Control i els mateixos nivells que el Control en el grup HC+F. La capacitat antioxidant del plasma pot provenir de diferents fonts, com per exemple de l'àcid úric ²¹². En la Figura 72B s'observa una disminució de l'àcid úric respecte el Control en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, sent aquesta disminució més evident en el grup d'ingesta de fibra soluble en un context de dieta hipercalòrica. Per tant, no s'observa una correlació entre els nivells de FRAP i l'àcid úric, suggerint que la fibra soluble pot contribuir a la capacitat antioxidant del plasma.

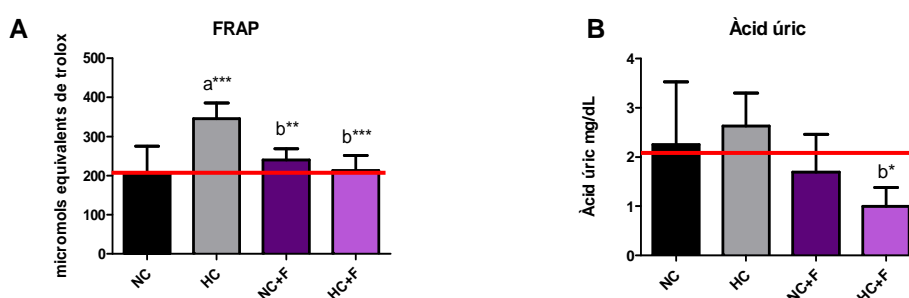


Figura 72. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb fibra soluble.

Capacitat antioxidant pel mètode FRAP (micromols equivalents de trolox) del plasma (A) i determinació de l'àcid úric (mg/dL) del plasma (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a NC i b amb respecte HC).

C. DISCUSSIÓ

És important senyalar que la ingesta de fibra ha estat un dels principals focus d'estudi en la reducció de la RI. Aquesta reducció de la RI s'ha atribuït als efectes hormonals, intrínsecs i en el colon produïts per la fibra amb la consegüent pèrdua de pes. L'obesitat és un factor fortament relacionat amb la RI, ja que a mesura que augmenta l'obesitat, el risc de RI i DM2 augmenten ²⁹⁷. En relació amb això, la fibra és inversament proporcional al guany de pes i l'obesitat ²⁷³. En aquesta tesi s'observa que en els ratolins amb una dieta normocalòrica i fibra soluble hi ha més disminució de pes

que amb l'adequació energètica. Amb una dieta hipercalòrica amb fibra soluble no van augmentar pràcticament de pes. Diverses hipòtesis sobre perquè la fibra redueix l'augment de pes poden ser trobades a la literatura, i pot ser a causa de que les fibres, especialment les solubles, tenen la capacitat de disminuir la velocitat del trànsit intestinal o augmentar la sacietat i disminuir l'absorció de nutrients a l'intestí prim ²⁷⁶. Per exemple en la Figura 73 es pot observar els mecanismes fisiològics pels quals la fibra afecta la regulació del pes corporal. Respecte aquesta evidència, en aquest capítol s'han observat indicis de la disminució de l'absorció d'energia en els dos grups amb una ingesta de fibra soluble, ja que al mesurar la quantitat de carbohidrats en el contingut cecal i femta s'observa un augment de quatre vegades més, tot i que l'addició de fibra soluble va ser de dos vegades superior.

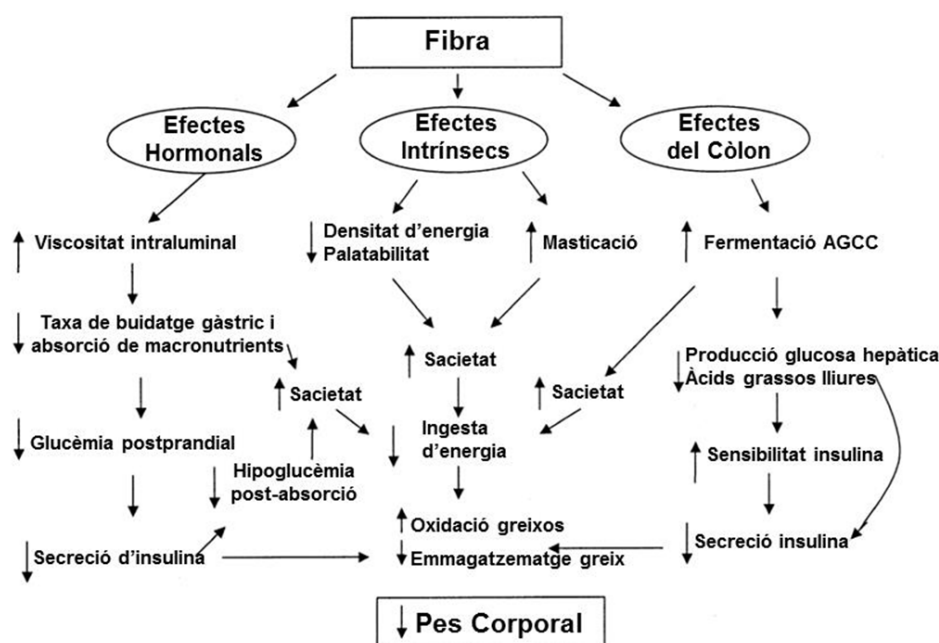


Figura 73. Mecanismes fisiològics pels quals la fibra afecta la regulació del pes corporal.

Hi ha efectes intrínsecs, hormonals i al còlon que disminueixen la ingesta d'aliments mitjançant la promoció de la sacietat. La fibra també disminueix el buidament gàstric i/o retarda l'energia i l'absorció de nutrients, el que porta a disminuir la glucosa postprandial i els nivells de lípids. La fibra també pot influir en l'oxidació de greixos i l'emmagatzematge de greix. Figura adaptada de Slavin ²⁷⁶.

Tot i aquestes afirmacions respecte el pes, els ratolins del grup HC+F no van disminuir de pes com el grup NC però van mostrar els mateixos valors en la corba de glucosa. Per tant, hi ha un valor afegit en la fibra soluble que està involucrat en la RI i no en el canvi de pes corporal. Podria ser l'existència d'un efecte sistèmic dels productes de fermentació o dels pèptids de sacietat i que estiguin involucrats amb un augment de l'AMPK α .

Els resultats observats indiquen que la ingesta de fibra soluble s'associa significativament a una millora de la sensibilitat a la insulina independentment del seu consum de greixos. Per exemple, en un estudi es va associar un augment de la ingesta de fibra independentment a la ingesta de greixos a unes probabilitats més baixes de SM ²²⁵. Per tant, ja que el contingut calòric i de greix era superior en el grup HC i els efectes observats en la sensibilitat a la insulina van ser similars, l'efecte de l'augment de la sensibilitat a la insulina pot ser atribuïda *per se* a la fibra soluble. A més, els canvis observats en els diferents paràmetres relacionats amb el mitocondri segueixen el mateix patró. Hi ha un augment de l'AMPK α , de l'ADNmt i de la porina en el múscul i en general un augment dels complexos mitocondrials a les dues dietes amb l'addició de fibra soluble.

Amb l'addició de fibra soluble a la dieta no s'evidencia una memòria metabòlica en el teixit muscular en comparació amb el tractament amb dieta normocalòrica. Fins i tot, es pot suggerir que hi ha un augment de la biogènesi mitocondrial en aquests dos grups, ja que hi ha un augment de l'ADNmt juntament amb un augment de les proteïnes relacionades amb el mitocondri i la seva biogènesi. Respecte aquestes dades, hi ha un estudi que va suggerir un augment de la biogènesi mitocondrial en el múscul esquelètic de rates alimentades amb fibra soluble ²⁹⁶.

Aquests canvis observats en els diferents paràmetres mitocondrials podrien ser a causa de la disminució de la disponibilitat energètica o a través de les hormones de sacietat o dels efectes associats amb els AGCC formats per la microflora del còlon com va suggerir Galisteo et al ²⁹⁸. S'ha estudiat que aquests AGCC tenen un paper fisiològic clau, ja que poden influir en la sacietat, en sensibilitat a la insulina, en la ingesta d'energia i en la secreció d'hormones i molècules de senyalització cel·lular presents en el còlon com per exemple l'estimulació de PPAR γ i l'augment del contingut de GLUT4 ^{276,288}.

També hi ha dades que suggereixen que els mecanismes pels quals la fibra millora la sensibilitat a la insulina poden convergir en el mitocondri. Per exemple un article publicat per Gao et al ²⁹⁴ van observar com el butirat va induir activitat de PGC-1 α i va activar AMPK α , suggerint que pot ser un mecanisme molecular pel qual estimula la funció mitocondrial. Per tant, en aquest sentit es podria suggerir una relació entre l'augment de la biogènesi mitocondrial en el múscul amb una ingesta de fibra.

En aquest capítol, es pot observar com la fibra soluble prevé la RI provocada per una ingesta alta en greixos i retorna a uns nivells encara més baixos de glucèmia en els ratolins amb RI. A més, s'ha trobat una relació entre aquest augment de la sensibilitat a la insulina i els canvis observats en el mitocondri, ja sigui a través d'una disminució de l'energia o la producció dels AGCC al còlon que promogui la funcionalitat mitocondrial i un augment en el metabolisme. Tot i això, respecte al dany oxidatiu proteic, s'ha observat en general un augment. S'hipotetitza que aquest augment del dany podria ser a causa d'un augment de la sensibilitat a la insulina i consegüentment a un augment de l'energia a metabolitzar, ja que hi ha un excés energètic o també podria estar relacionat amb l'augment dels complexos mitocondrials. S'ha estudiat que entre els diferents complexos, els complexos I i III són els màxims productors de ROS al mitocondri. I per tant, podria ser que l'augment dels complexos I i III en el múscul i del complex III en el teixit adipós es relaciones amb un augment del dany oxidatiu proteic. A més, hi ha un augment de la SOD1 en el múscul i en el teixit adipós, que suposadament es deu a l'augment de la defensa antioxidant per l'augment del dany, tot i que aquest dany no disminueix. No s'observa un augment de la proteïna anti-apoptòtica BCL2 tot i que s'ha estudiat que els increments en el grau d'estrès oxidatiu tendeixen a induir apoptosi a través de la via mitocondrial ²⁹⁹

Per tant, si es té en compte únicament l'augment de la sensibilitat a la insulina, aquests resultats són interessants com a intervencions dietètiques en els subjectes obesos en risc de desenvolupar RI. A més, els resultats d'aquest estudi indiquen que la ingesta de fibra soluble s'associa a una disminució de la SM, sent una potencial implicació clínica i que recolza la noció de la importància de la inclusió de fibra a la dieta. En aquest sentit, seria de gran importància fer èmfasis a la inclusió d'aliments rics en fibra a la dieta com per exemple llegums, fruites, verdures i grans sencers. No obstant, és indispensable estudiar les repercussions de l'augment del dany oxidatiu, ja que en aquest capítol s'ha observat un increment dels marcadors amb la ingesta de fibra. En relació amb això, són necessaris més estudis per aclarir els mecanismes de l'addició de fibra a la dieta en la funcionalitat mitocondrial i la relació amb l'augment del dany oxidatiu proteic i les seves repercussions.

V.4. Efecte del tractament amb Soja

A. INTRODUCCIÓ

La soja pertany a la família de les lleguminoses, sent una font rica de proteïnes vegetals, hidrats de carboni complexos, greixos poliinsaturats, fibres solubles i fitoestrògens (isoflavones). Aquesta barreja de compostos ha fet que la soja estigui àmpliament estudiada com una de les principals intervencions nutricionals per a la prevenció i el tractament de malalties, tot i que la seva complexitat fa que els efectes observats siguin difícils d'atribuir-ho a un sol compost.

El 1999, la FDA va aprovar la declaració de propietats saludables dels beneficis de la proteïna de soja per a reduir el colesterol en referència a un consum de 25 g/dia de proteïna de soja ³⁰⁰. A més de la millora del perfil lipídic plasmàtic ^{301,302}, s'ha documentat que el consum de soja indueix una disminució dels nivells sèrics de marcadors inflamatoris ³⁰³, millora de la salut òssia ³⁰⁴, redueix els símptomes de la menopausa ³⁰⁵ i produeix una lleugera reducció del risc de càncer de mama ^{306,307} i pròstata ³⁰⁸.

En relació al metabolisme de la glucosa, són molts els estudis que suggereixen efectes beneficiosos del consum de soja. Així, estudis en animals indiquen que la proteïna de la soja o les isoflavones milloren el control glucèmic, disminueixen els requeriments insulínics i incrementen la sensibilitat a la insulina ³⁰⁹⁻³¹². Respecte la salut humana, diversos estudis observacionals han suggerit que el consum de soja està associat amb un millor control de la glucèmia o un menor risc de diabetis ³¹³⁻³¹⁶.

Tot i això, les dades d'assajos en humans revisades en un meta-anàlisi han generat resultats controvertits ³¹⁷. Alguns estudis van demostrar que els productes de soja milloren significativament el control glucèmic, mentre que altres no van observar cap efecte significatiu. Aquestes variacions en els estudis poden ser a causa d'una sèrie de possibles raons com ara la varietat de productes de soja analitzats, l'estat de salut base dels participants, l'estat menopàusic de les participants, la durada de l'estudi, l'adhesió de la intervenció i el grau de control de la ingesta, així com el grau de resposta entre subjectes. Per exemple, Serrano et al ³¹⁸ van mostrar una gran variació en els canvis del perfil lipídic entre subjectes que van ingerir una beguda de soja depenent d'un genotip.

En aquest sentit, el meta-anàlisi abans esmentat conclou que el consum de soja no va mostrar un efecte favorable en la reducció de la glucosa en dejú i en les concentracions d'insulina, però es va observar un canvi favorable en les concentracions de glucosa en dejú en els estudis que van utilitzar aliments de soja sencers o una dieta amb soja ³¹⁷. Per tant, es podrien atribuir els canvis en la presència d'altres components de la soja, o també els diferents procediments de processament en la preparació dels productes de soja. A més, en aquest meta-anàlisi la majoria d'assajos clínics utilitzen els productes làctics com a control i diversos estudis han suggerit que els productes làctics poden influir en el risc de la diabetis i la SM.

Els mecanismes en el metabolisme de la glucosa pels quals la soja té efecte no estan clars, possiblement a causa de la diversitat de components presents en ella. Respecte a les isoflavones, estudis *in vitro* suggereixen que tenen propietats antidiabètiques com ara la inhibició de l'absorció intestinal de glucosa, accions inhibidores de la α -glucosidasa i de la tirosina quinasa ^{319,320}. A més hi ha un estudi que va suggerir que els fitoestrògens podrien alterar el metabolisme mitocondrial a favor d'un increment en l'eficiència de la β -oxidació al tenir la capacitat d'activar AMPK i incrementar l'expressió de PPARs en el fetge, teixit adipós blanc i múscul esquelètic ³²¹. A més, s'ha proposat que els flavonoides i els seus derivats indueixen la biogènesi mitocondrial a través de l'activació o expressió de Sirt1 en les cèl·lules tubulars renals proximals ³²². Més recentment, un estudi ha evidenciat que el coumestrol (isoflavona natural present a la soja) és capaç d'induir l'activitat de SIRT1 i la biogènesi mitocondrial en un cultiu de miòcits. En un estudi en rates Zucker fa/fa obesas hiperinsulinèmiques, van demostrar que la proteïna de soja en comparació amb la caseïna augmenta els nivells de mRNA del PPAR- α ³²³. Per tant, atribuint que les alteracions de la lipogènesi hepàtica i l'oxidació d'àcids grassos poden ser responsables de la disminució dependent de la proteïna de soja en la producció de lipoproteïnes ³²³.

Hi ha estudis que reporten un efecte antioxidant de la soja que es creu que pot ser a causa del seu contingut de fitoestrògens ³²⁴. En un estudi realitzat en dones d'edat avançada amb SM van veure que el consum diari de soja va millorar l'estrès oxidatiu i el control de la glucèmia ³²⁵. No obstant, un estudi realitzat en dones menopàusiques amb una ingesta de 40 g de proteïna de soja al dia van mostrar que ni les isoflavones ni els fitats van tenir efecte significatiu en la reducció del dany oxidatiu ³²⁶ o un altre en el que indiquen que no es van veure afectats els marcadors d'estrès

oxidatiu ³²⁴ o una manca de canvi de malondialdehid després de l'administració de suplementes d'isoflavones de soja ³²⁷.

A més, la soja té una alta concentració d'àcids grassos poliinsaturats ³²⁸ que poden sofrir peroxidació. Per exemple, en un estudi ³²⁹ en que van afegir farina de soja a una dieta de cafeteria a rates, van augmentar la peroxidació lipídica en el pulmó. Tot i que també s'ha descrit una acció antioxidant de les isoflavones que ajuden a reduir la peroxidació lipídica ^{330,331}.

Respecte aquestes evidències descrites, és de gran importància avaluar els efectes beneficiosos o adversos de la soja en un context de dieta hipercalòrica, ja que és una de les principals característiques de l'estil de vida moderna. I així avaluar l'efecte de la soja en el control de la glucèmia, el mitocondri i l'estrès oxidatiu.

B. RESULTATS DEL TRACTAMENT NUTRICIONAL AMB SOJA EN UN CONTEXT NORMOCALÒRIC I HIPERCALÒRIC

Taula 11. Composició nutricional de la beguda de soja (g/100 mL).

Composició beguda de soja	g/100 mL
Proteïna	3,1
Carbohidrats	4,1
Sucres	2,7
Fibra	0,5
AGS	0,26
AGM	0,40
AGP	1,04
Omega-6	0,9
Omega-3	0,14

Es van incorporar 340 mL de beguda de soja en 1 kg de dieta. Aquesta beguda es produeix sobre la base de 13% de soja.

A continuació es mostraran els resultats obtinguts de l'estudi dels ratolins amb una disminució de la sensibilitat a la insulina alimentats amb una dieta normocalòrica, dieta hipergrassa i la seva combinació amb l'addició d'una beguda a base de soja.

La composició per 100 mL de beguda de soja es mostra en la Taula 11. A 1 kg de dieta es va incorporar 340 mL de beguda de soja i que és l'equivalent a 500 mL de beguda de soja al dia en una dieta humana. La composició de les dietes es pot observar en l'apartat de materials i mètodes en la Taula 2. De totes maneres, cal mencionar que la incorporació de soja, modifica la qualitat de la proteïna, carbohidrats i greixos. Ja que les quantitats d'aquests compostos aporta el 4% de proteïna d'origen vegetal, el 3% de fibra és aportada per la soja (s'ha disminuït la cel·lulosa de la dieta per igualar el contingut en fibra) i el greix aportat per la soja a la dieta és d'un 5,5% en el cas de la

dieta normocalòrica i del 1,8% en el cas de la dieta hipercalòrica. Per tant, s'ha de tenir en compte que l'origen de la fibra i de la proteïna és diferent i hi ha un valor afegit en el contingut del greix, ja que la soja té una aportació d'omega-3.

1. INGESTA, PES I PERFIL LIPÍDIC

Durant els dos mesos de tractament es va fer un seguiment setmanal del consum alimentari i del pes corporal. Al finalitzar el tractament es va obtenir plasma per l'anàlisi del perfil lipídic.

En la Figura 74 es mostra l'evolució del pes durant els dos mesos de tractament. S'observa el mateix canvi de pes en les dietes normocalòriques com hipercalòriques independentment de l'addició de soja. Per tant, amb l'addició de soja no s'observen canvis afegits a l'efecte propi de la dieta.

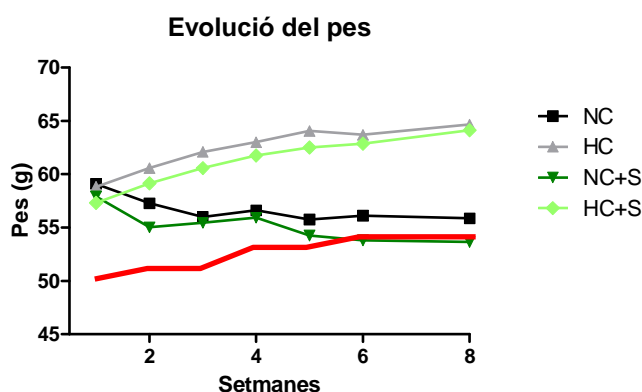


Figura 74. Evolució del pes durant 8 setmanes de tractament amb soja.

Evolució del pes (g) per setmana (A). La línia roja indica l'evolució del pes del Control (dieta normocalòrica durant tot l'experiment).

No obstant aquests resultats, hi ha un estudi que dona suport al rol de la soja en la pèrdua de pes en ratolins obesos on l'addició de proteïna de soja va fer més efectiva aquesta reducció de pes³³². Són necessaris més estudis, ja que en humans també s'han observat resultats contradictoris en la pèrdua de pes, on hi ha estudis que no s'ha evidenciat un efecte entre la ingesta de soja i la pèrdua de pes^{333,334}.

Respecte el consum d'aliment no s'observen diferències significatives entre grups (Taula 12), tot i que els grups amb una ingesta de dieta hipercalòrica tendeixen a reduir la seva ingesta. En canvi, quan s'igualava el consum per les calories, s'observa que els ratolins amb una dieta hipercalòrica tendeixen a consumir una quantitat calòrica major. Encara que no hi hagi diferències significatives entre HC i HC+S, s'observa una tendència a reduir el consum en el grup HC+S.

Taula 12. Guany de pes corporal, consum d'aliment i paràmetres bioquímics del plasma després de dos mesos de tractament amb soja.

	NC	HC	NC+S	HC+S
Pes inicial (g)	59,1±9,3	58,8±8,7	57,9±6,8	57,3±5,8
Pes final (g)	55,9±8,0	64,7±9,8	53,6±6,4	64,1±6,3
Guany pes corporal (g)	-3,2±2,5	5,8±1,4 ^{a***}	-4,3±1,5 ^{b***}	6,8±3,0 ^{a,c***}
Consum d'aliment (g dieta setmana/g de pes animal)	0,55±0,06	0,47±0,11	0,55±0,05	0,45±0,01
Consum energètic (kcal setmana/g de pes animal)	2,13±0,23	2,79±0,67 ^{a*}	2,13±0,20 ^{b*}	2,64±0,07
Colesterol total (mg/dL)	188,6±55,5	239,0±60,7	173,2±30,0	195,1±27,1
HDL (mg/dL)	106,1±24,1	117,5±23,4	120,0±7,7	148,2±7,1 ^{a**,b*}
LDL (mg/dL)	114,8±38,2	104,1±25,3	103,0±18,5	119,8±29,7
TG (mg/dL)	74,5±16,6	63,2±20,3	84,7±27,0	69,4±25,5
HDL/Col. Total	0,58±0,08	0,53±0,09	0,71±0,09 ^{b*}	0,71±0,11 ^{b*}
HDL/LDL	1,18±0,48	1,16±0,27	1,2±0,22	1,19±0,22

S'observen diferències estadísticament significatives en el pes corporal, el consum dietari i en el perfil lipídic entre els grups. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p<0.05$ ** $p<0.01$ *** $p<0.001$ a amb respecte a NC, b amb respecte a HC, c comparant NC+S i HC+S). Les relacions HDL/Col. Total i HDL/LDL s'han calculat en base als resultats individuals (no s'ha calculat la relació en base al promig).

En l'estudi del perfil lipídic (Taula 12), s'observa una tendència a la disminució del colesterol total en els dos grups amb una ingesta de soja comparant amb els seus controls (NC i HC). Respecte HDL s'observa un augment en els dos grups amb ingesta de soja, sent aquest augment significatiu en el grup HC+S. En el LDL no s'observen diferències significatives entre grups, tot i que el grup HC+S tendeix a tenir més quantitat. La relació HDL/Col. total es troba incrementat en els dos grups amb l'addició de soja. Aquest increment pot ser a causa principalment de l'increment d'HDL, el qual pot estar explicat per l'efecte estrogènic de les isoflavones³³⁵. Finalment, en els TG encara que no s'observen diferències significatives entre els grups, els dos grups amb una ingesta normocalòrica tendeixen a augmentar el seu valor. Per tant, els canvis observats en el perfil lipídic es poden atribuir a l'efecte dels compostos bioactius presents en la soja com per exemple les isoflavones o la proteïna vegetal. Hi ha estudis que observen una millora en el perfil lipídic amb la ingesta de soja³³¹, no obstant això, hi ha estudis en la literatura que estan en consonància amb els resultats presentats, per exemple en un estudi es va observar una absència d'efectes sobre el colesterol total i els TG després del consum d'un aïllat de proteïna de soja en ratolins³³²

o un altre estudi en humans on tampoc es van observar efectes significatius sobre els lípids sanguinis amb una suplementació de soja en subjectes hipercolesterolemiant després de 24 setmanes ³³⁶.

Després del sacrifici es va extreure el contingut cecal dels ratolins i es va recollir la femta per poder estudiar el contingut de carbohidrats present en aquestes mostres. En la Figura 75 no s'observen diferències significatives en el contingut cecal entre els grups, no obstant això, hi ha un augment significatiu en el grup NC+S respecte els dos grups amb una ingesta hipercalòrica. En relació amb aquests resultats, un estudi *in vitro* suggereix que les isoflavones inhibeixen l'absorció intestinal de carbohidrats ³¹⁹ que es podria veure reflectit en la femta en el grup NC+S. No obstant, aquest efecte es perd en el grup HC+S.

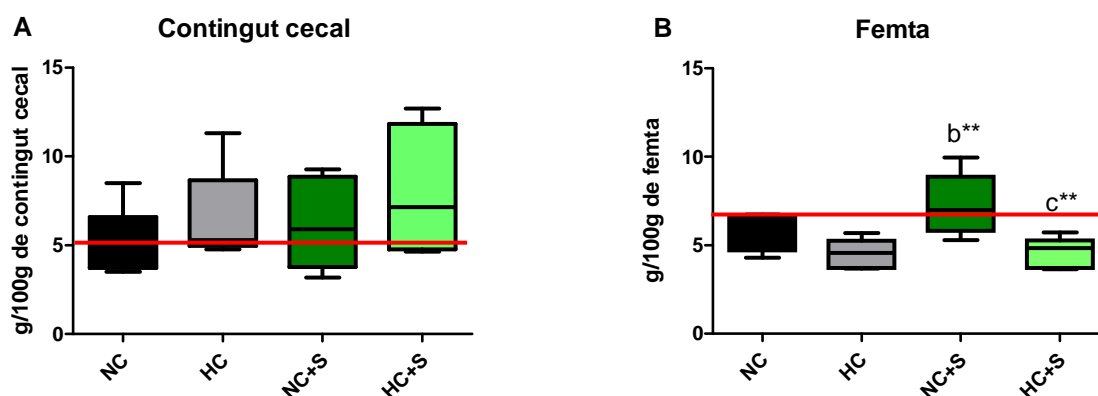


Figura 75. Nivells de carbohidrats en el contingut cecal i en la femta després de dos mesos de tractament amb soja.

Nivells de carbohidrats (g/100g) en el contingut cecal (A) i en la femta (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (**p<0.01. b amb respecte a HC i c comparant NC+S i HC+S).

Un cop analitzats els canvis en la ingesta, pes i perfil lipídic per l'addició de la soja, es vol observar si a més, hi ha una influència en la sensibilitat a la insulina. Per tant, al punt final de l'experiment es van realitzar probes per determinar la sensibilitat a la insulina.

2. SENSIBILITAT A LA INSULINA

Per determinar la sensibilitat a la insulina, es va realitzar una corba de tolerància a la glucosa, una corba de resposta glucèmica a la insulina i s'avaluarà la fructosamina, GLUT4, GLUT2 i AMPK α . Per realitzar la corba de tolerància a la glucosa, es van mesurar els nivells de glucosa al temps basal, 20, 40, 60 i 120 minuts després de la injecció de 2 g de glucosa per kg de pes del ratolí.

Com s'observa en la Figura 76A el grup NC+S mostra un mateix comportament que el grup NC i s'observa una diferència significativa entre NC+S i HC en el minut 20 i 120. Respecte HC+S no reverteix els valors com una dieta normocalòrica, tot i que s'observa una tendència a disminuir en els diferents punts, solament hi ha una diferència significativa en el temps basal respecte NC i NC+S. Respecte l'àrea sota la corba glucèmica (Figura 76B), el grup HC+S presenta un 33% més d'àrea sota la corba que el grup NC encara que disminueix un 13% l'àrea sota la corba respecte el grup HC. Per tant, la ingesta de soja en un context de dieta hipercalòrica ajuda a disminuir els valors de glucèmia però sense revertir-los als nivells amb una dieta normocalòrica i sense modificar el pes de l'animal.

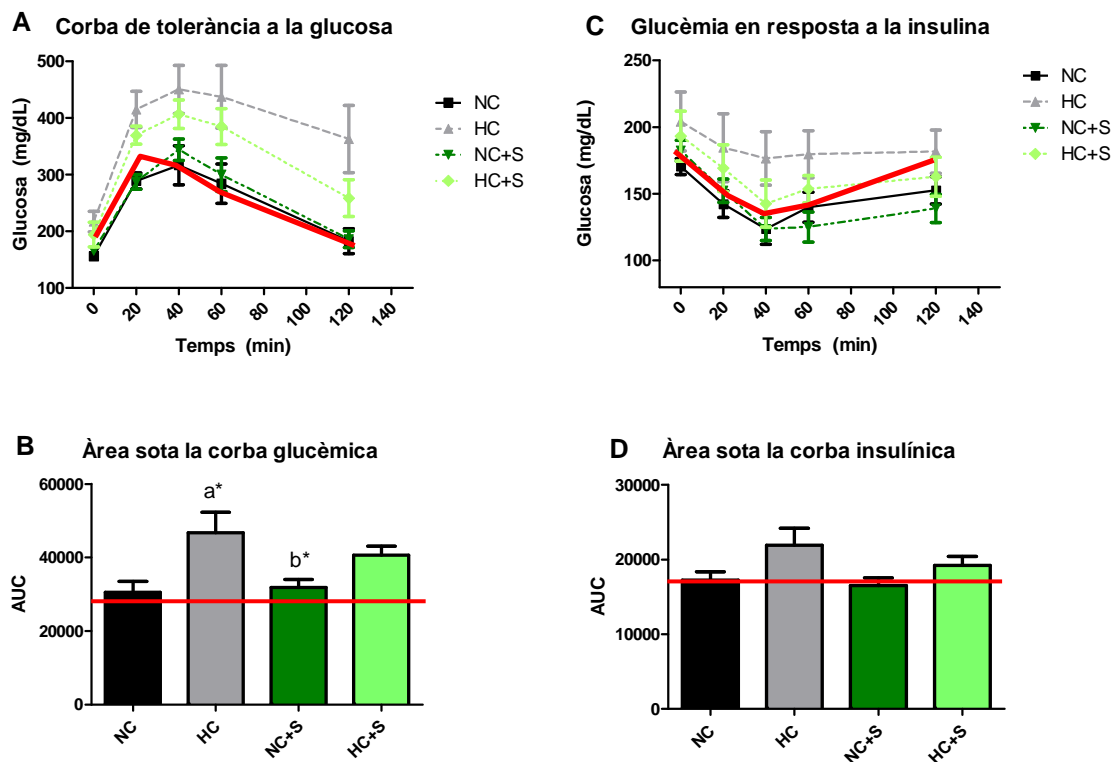


Figura 76. Sensibilitat a la insulina després de dos mesos de tractament amb soja.

Corba de tolerància a la glucosa (A) i la seva corresponent àrea sota la corba (B) i Resposta glucèmica a la insulina (C) i la seva corresponent àrea sota la corba (D). La línia roja indica el Control. En la corba de tolerància a la glucosa (A) s'observen diferències en els minuts 20 i 120. Al minut 20 hi ha diferències en el grup NC+S respecte el grup HC ($p < 0.001$) i en el grup HC+S respecte NC i NC+S ($p < 0.05$). Al minut 120 s'observa una diferència en el grup NC+S respecte el grup HC ($p < 0.01$). En la glucèmia en resposta a la insulina (C) s'observen diferències en el minut 60 respecte NC+S i HC ($p < 0.05$). Les diferències entre NC i HC de la Figura 76A i 76C es comparen en la Figura 7. Els valors marcats en la Figura 76B i 76D mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$ a respecte NC i b respecte HC).

Respecte al test de resposta glucèmica a la insulina, no s'observen diferències entre els dos grups amb una ingesta normocalòrica, mostrant a més el grup NC+S una diferència significativa en el minut 60 respecte HC (Figura 76C). En el grup HC+S s'observa una tendència a disminuir els seus valors respecte el grup HC. Per tant, la

soja en un context de dieta hipercalòrica i normocalòrica ajuda a augmentar la sensibilitat a la insulina. Aquests resultats anirien en relació amb un estudi on la proteïna de la soja va millorar la tolerància a la glucosa i la sensibilitat a la insulina en rates ³¹¹ i també on l'administració d'extracte d'isoflavones de soja va millorar la tolerància a la glucosa i va prevenir la RI amb una dieta alta en greixos en rates ovariectomitzades ³³⁷.

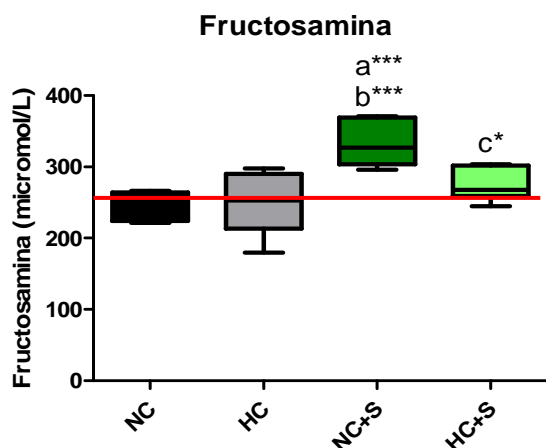


Figura 77. Fructosamina en plasma després de dos mesos de tractament amb soja.

Concentració de fructosamina (micromol/L) en plasma. La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre grups ($p < 0.05$, *** $p < 0.001$ a respecte NC, b respecte HC i c comparant NC+S i HC+S).

Respecte la concentració de fructosamina (Figura 77) s'observa com els valors del grup NC+S són significativament majors que els altres grups, tot i la disminució del contingut calòric de la dieta i els nivells en la corba de glucosa. Sembla ser, que la soja en un context de dieta normocalòrica incrementa els valors de fructosamina, que podria ser per la fructosa afegida en la beguda de soja. Tot i que, en el grup HC+S no s'observa aquest efecte.

En les gràfiques següents es mostren els resultats de la quantificació de GLUT4 en el múscul i teixit adipós i de GLUT2 en el fetge (Figura 78).

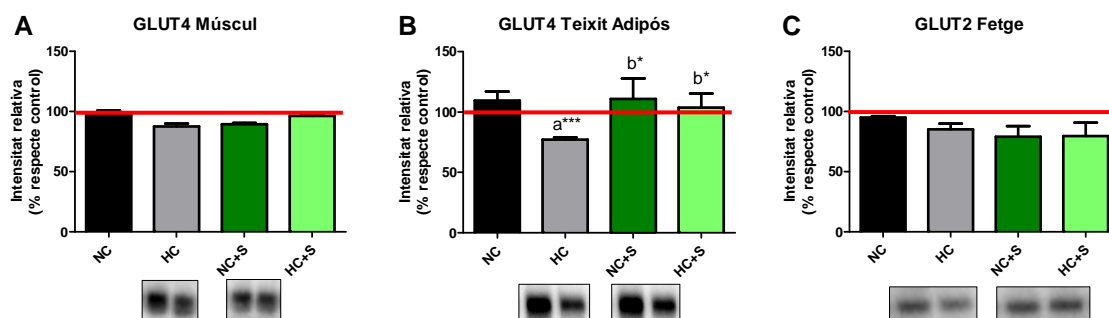


Figura 78. Quantificació de GLUT4 i GLUT2 després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació per densitometria de GLUT4 en múscul (A) i teixit adipós (B) i de GLUT2 en fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ *** $p < 0.001$, a amb respecte a NC, b amb respecte HC).

En el teixit muscular no s'observen diferències significatives entre els grups. En canvi, en el teixit adipós, hi ha un augment significatiu de la quantitat de GLUT4 de tots els grups respecte HC. En el fetge, no s'observen diferències significatives entre grups dels nivells de GLUT2. Aquestes observacions podrien estar en relació amb l'augment de la sensibilitat a la insulina en el grup HC+S.

En relació amb els nivells d'AMPK α (Figura 79), en el múscul s'observa un augment significatiu en el grup NC+S respecte els grups NC i HC, en el teixit adipós el grup NC retorna als nivells del Control (línia roja), i el grup HC+S tot i que s'observen diferències respecte el grup NC+S tendeix a augmentar els nivells respecte HC. En canvi, en el fetge tot i la tendència a l'augment en els grups amb una ingesta de soja, no s'observen diferències significatives. Aquests resultats van en relació amb un estudi en ratolins on els fitoestrògens van tenir la capacitat d'activar l'AMPK ³²¹, ja que en els tres teixits s'observa o un augment significatiu o una tendència a l'augment de l'AMPK α en els dos grups amb una ingesta de soja.

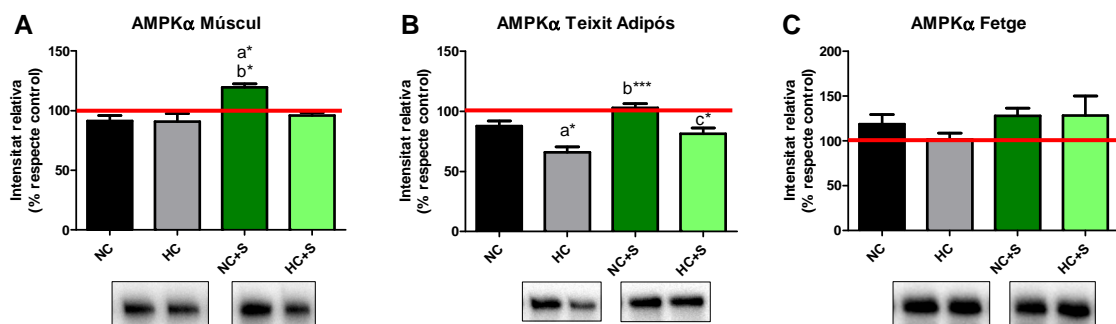


Figura 79. Quantificació d'AMPK α després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació d'AMPK α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (* p <0.05 *** p <0.001. a amb respecte a NC, b amb respecte a HC i c comparant NC+S i HC+S).

En termes generals, s'observa que l'addició de soja indueix una major sensibilitat a la insulina tant en dietes normocalòriques com hipercalòriques, sent aquests efectes més marcats a nivell molecular en el context de dietes normocalòriques. Possiblement l'addició de grassa disminueixi els efectes a nivell molecular (AMPK α , GLUT4 i GLUT2) i a conseqüència a nivell clínic (corba de tolerància a la glucosa i corba de sensibilitat a la insulina).

3. CANVIS EN L'ADNmt i PROTEÏNES RELACIONADES AMB EL MITOCONDRI

3.1. ADNmt

Quan s'avalua el nombre mitocondrial per l'avaluació de la relació ADNmt i ADN nuclear (Figura 80), no s'observen diferències significatives entre els grups, tot i que en el múscul hi ha una tendència a la disminució en el grup NC+S i en el fetge s'observen els mateixos nivells que el Control (línia roja) en el grup NC+S.

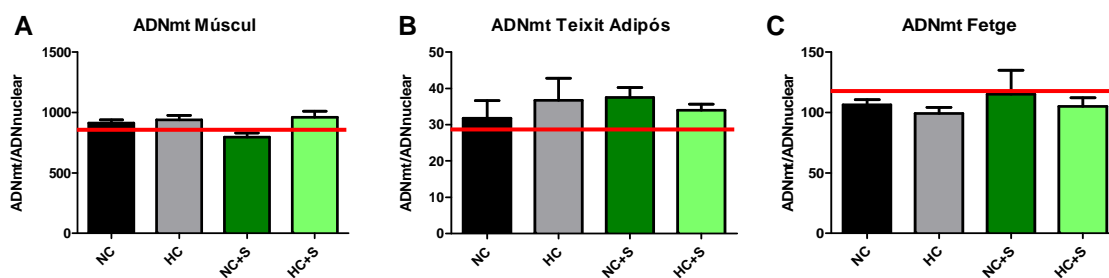


Figura 80. Avaluació de l'ADNmt després de dos mesos de tractament amb soja.

Avaluació de l'ADNmt en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant el marcador Cytb i es normalitza i es determina segons l'amplificació del gen Actb utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta Ct}$). La línia roja indica el Control. No s'observen diferències significatives entre grups.

3.2. PORINA

Respecte a la porina (Figura 81), s'observa en el grup NC+S un augment significatiu en el múscul respecte els altres grups i amb uns nivells superiors que el Control. Respecte el grup HC+S hi ha un retorn als nivells del Control en el múscul i fetge i s'observa nivells majors que el Control en el teixit adipós. Quan s'igualava la porina amb l'ADNmt s'observa el mateix comportament entre grups a causa de que no existeixen diferències significatives en l'ADNmt entre grups en els diferents teixits analitzats.

L'augment de la porina en els tres teixits en els grups NC+S i HC+S respecte HC (en el grup HC+S hi ha una tendència a incrementar en el múscul i fetge i un augment significatiu en el teixit adipós) podria ser a causa de l'ús de l'energia emmagatzemada, suggerint que la despesa energètica estigui compensada entre la ingesta dietètica i les reserves energètiques (hi ha una disminució significativa de la ingesta energètica en el grup NC+S respecte HC i una tendència a disminuir en el grup HC+S respecte HC). Aquests canvis poden estar relacionats amb l'augment de la sensibilitat a la insulina en el grup HC+S encara que no hagin tingut una disminució del pes corporal.

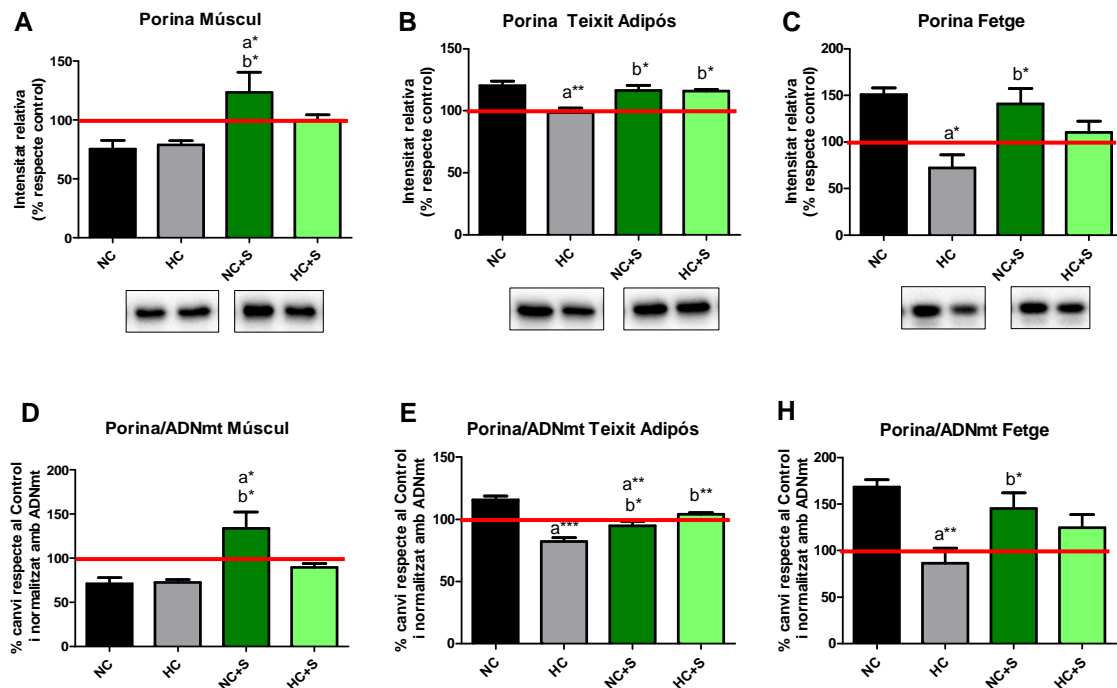


Figura 81. Quantificació de la porina després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de la porina per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C) i normalitzada amb l'ADNmt en el múscul (D), teixit adipós (E) i fetge (H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significativa entre grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+S i HC+S).

3.3. CANVIS EN ELS COMPLEXOS MITOCONDRIALS

Per estudiar si hi ha una alteració en la capacitat funcional del mitocondri amb la ingesta de soja, és va avaluar el contingut de proteïnes de la cadena de transport d'electrons mitocondrial, així com proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial i en la morfologia dels mitocondris en el múscul, teixit adipós i fetge dels ratolins.

3.3.1. Complexos mitocondrials en el múscul

En la Figura 82 s'observa un augment dels complexos mitocondrials en els dos grups amb una ingesta de soja, sent l'increment en el complex I i IV significativa. Per tant, la ingesta de soja augmenta fins a uns nivells majors que el Control els diferents complexos. Quan s'igualen els complexos amb l'ADNmt l'augment en els diferents complexos és major en el grup NC+S.

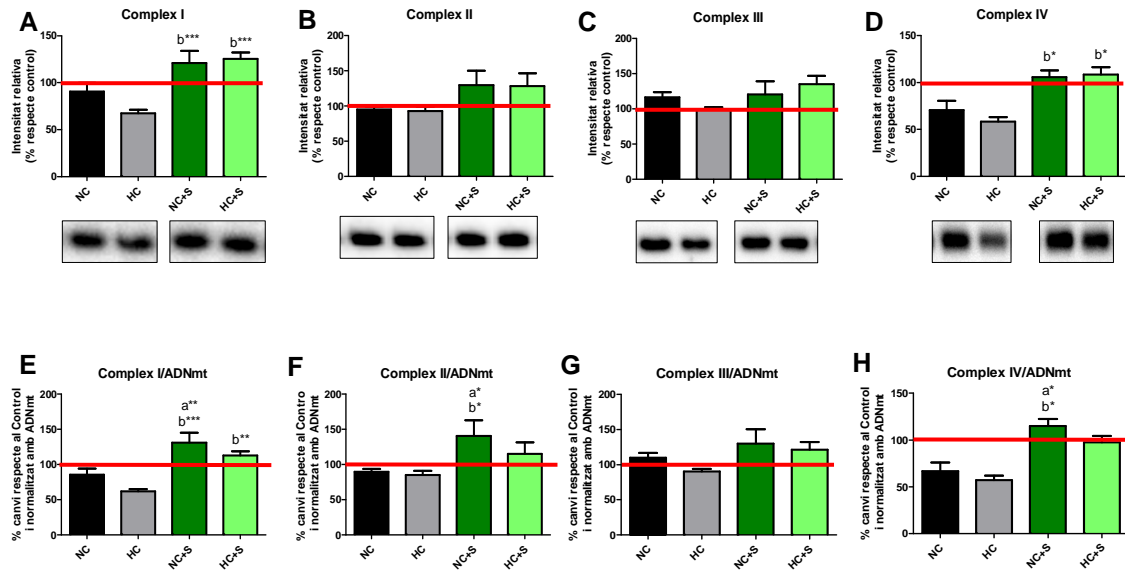


Figura 82. Complexos mitocondrials en el múscul després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit muscular (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ^{**} $p < 0.001$. a amb respecte NC, b amb respecte HC).

3.3.2. Complexos mitocondrials al teixit adipós

En la Figura 83 s'observa en el complex I i III un augment significatiu en el grup NC+S respecte els altres grups. En el complex II no s'observen diferències significatives entre els grups i en el complex IV els nivells en el grup NC+S i HC+S és menor que el Control (línia roja) havent els mateixos nivells que el grup HC.

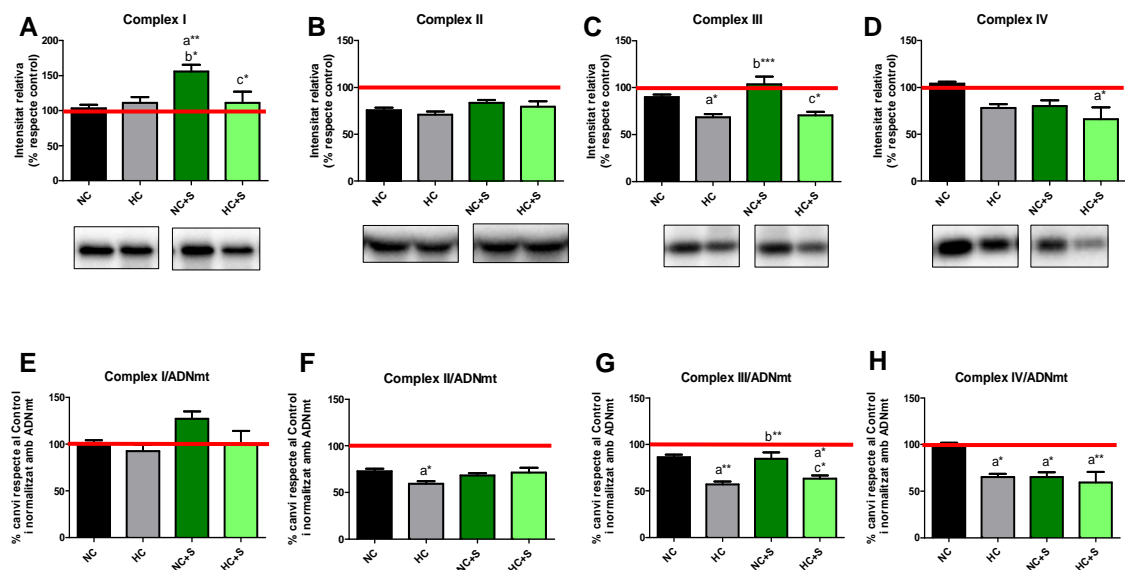


Figura 83. Complexos mitocondrials en el teixit adipós després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el teixit adipós (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ^{**} $p < 0.01$ ^{***} $p < 0.001$. a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+S i HC+S).

Quan s'igualen els complexos amb l'ADNmt (Figura 83 E-H) segueix havent el mateix patró, tot i que a diferència del complex I no arriben a uns nivells iguals que el Control, possiblement perquè s'observa una tendència cap a l'augment de l'ADNmt respecte el Control. A més, tant en el complex II com en el IV no s'observa una recuperació als nivells del Control.

3.3.3. Complexos mitocondrials al fetge

Respecte el teixit hepàtic (Figura 84), en el complex I s'observa en els dos grups amb una ingesta de soja uns nivells igual que el grup NC. En els complexos II i III en el grup HC+S hi ha uns nivells més baixos que els altres grups, atribuint-se aquest efecte a la soja, finalment en el complex IV s'observa un nivells més alts en el grup HC+S respecte HC retornant als nivells del Control.

Quan s'igualen els complexos amb l'ADNmt s'observa uns nivells majors o iguals que el Control (línia roja) en els dos grups amb una ingesta de soja. Cal remarcar que en el grup HC+S en el complex II/ADNmt no s'observen uns nivells superiors al Control a diferència dels altres grups.

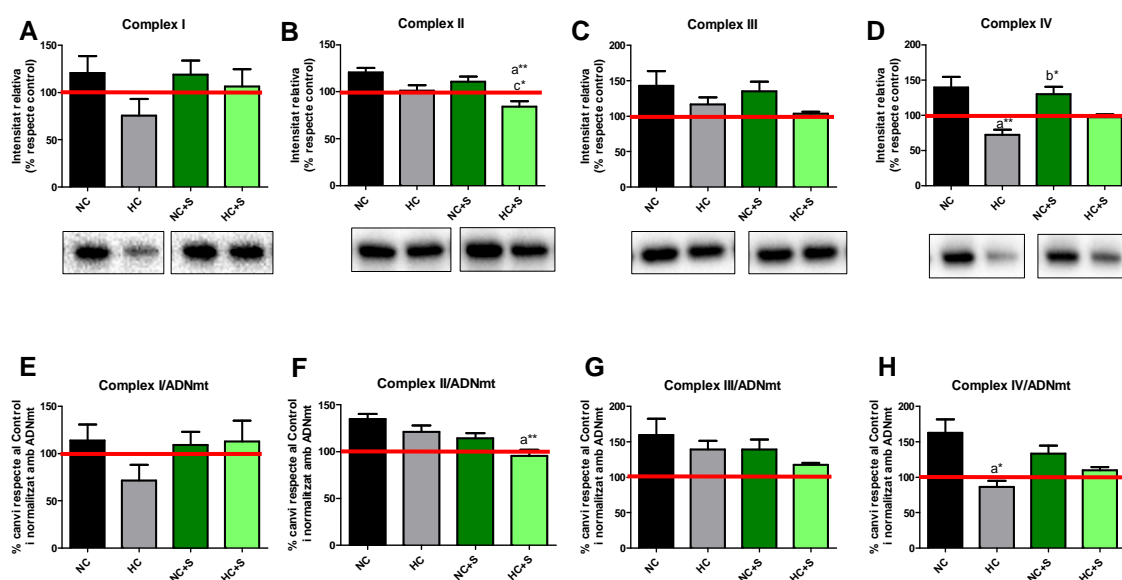


Figura 84. Complexos mitocondrials al fetge després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació dels complexos mitocondrials per densitometria en el fetge (A-D) i normalitzats amb l'ADNmt (E-H). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$). a amb respecte NC, b amb respecte HC i c comparant NC+S i HC+S).

Sembla ser que la ingesta de soja produeix canvis en diverses proteïnes que pertanyen a la cadena respiratòria mitocondrial, a la porina i a l'ADNmt. Suggestint que hi ha un augment d'entrada d'energia a la cèl·lula que es relaciona amb l'augment de la porina en els tres teixits i dels complexos mitocondrials en el múscul en els grups NC+S i HC+S. També comentar que els efectes en el patró dels complexos mitocondrials son més marcats en el teixit muscular que en els altres dos teixits. Ara bé, es vol observar si aquests canvis estan relacionats amb diverses proteïnes involucrades en la biogènesi mitocondrial.

3.4. SIRT1

En la Figura 85 s'observa en el múscul un augment significatiu en el grup NC+S respecte NC i HC i el grup HC+S retorna als nivells del Control. En el teixit adipós no hi ha una diferència significativa en els grups amb una ingesta de soja. Finalment en el fetge, s'observa en els dos grups amb una ingesta de soja un augment significatiu respecte els controls. En aquest sentit, Rasbach i Schnellmann van suggerir que les isoflavones indueixen la biogènesi mitocondrial a través de l'activació o l'expressió de SIRT1 en un cultiu cel·lular renal³²².

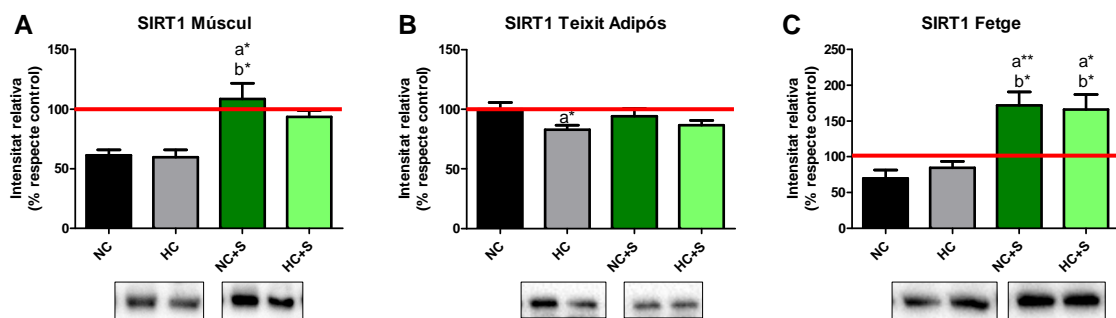


Figura 85. Quantificació de SIRT1 després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de SIRT1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències entre els grups (* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ a amb respecte NC, b amb respecte HC).

SIRT1 i AMPK α són dos sensors metabòlics que afecten directament a l'activitat de PGC-1 α i així poden millorar la condició metabòlica. Per tant, com s'observa en aquest capítol els valors de SIRT1 són similars als de l'AMPK α (Figura 79), tot i que en SIRT1 els dos grups amb una ingesta de soja presenten valors més elevats respecte els altres grups en el fetge en comparació amb els valors d'AMPK α .

3.5. PGC-1 α

En la Figura 86 s'observa en el múscul una tendència cap a l'augment en els grups amb una ingesta de soja, tot i que les diferències no són significatives. En el teixit adipós hi ha un augment significatiu en el grup NC+S respecte a NC, retornant a uns nivells com el Control. En el fetge no s'observen diferències significatives entre grups, encara que s'observa una tendència cap a l'augment en els dos grups amb una dieta normocalòrica.

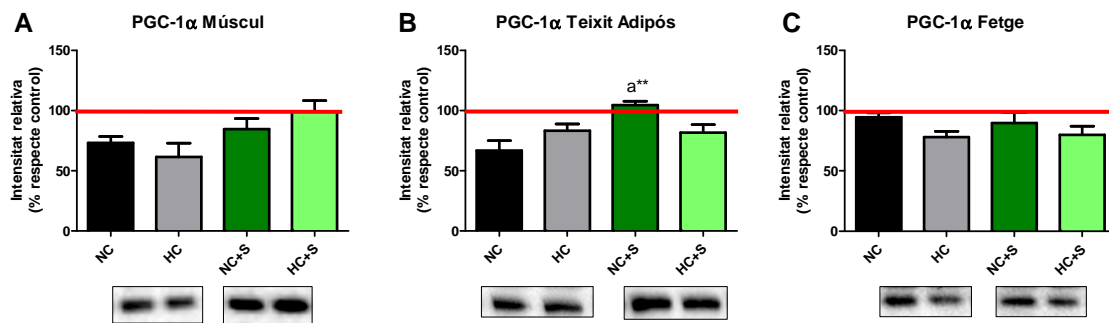


Figura 86. Quantificació de de PGC-1 α després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de PGC-1 α per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferència significativa entre els grups (^a p<0.01 a amb respecte NC).

3.6. MFN2

En la Figura 87 s'observa en el múscul una tendència a l'augment en els dos grups amb una ingesta de soja, retornant als mateixos nivells que el grup Control. En el teixit adipós, el comportament és el mateix depenent del tipus de dieta, tot i que els valors del grup NC+S són els mateixos que el Control (línia roja). En el fetge el grup NC+S mostra els mateixos nivells que NC, sent majors que el grup Control. Respecte el grup HC+S s'observa uns nivells majors respecte el grup HC. S'observa com aquests resultats presenten el mateix comportament que els resultats observats en l'AMPK α , possiblement a causa de la relació entre MFN2 i AMPK α .

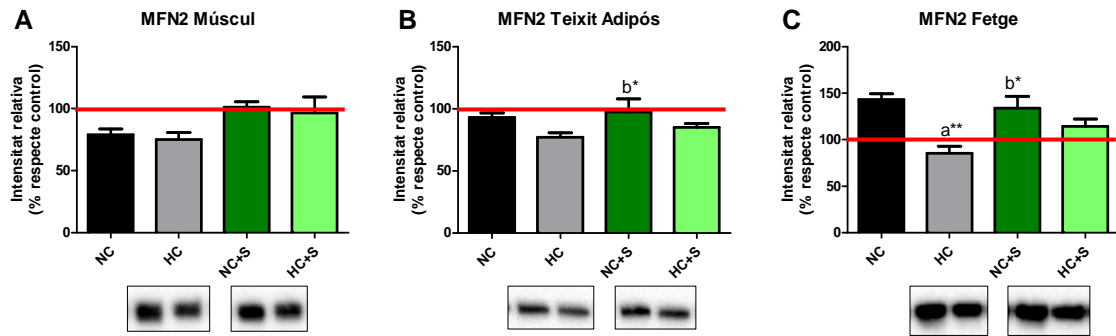


Figura 87. Quantificació de MFN2 després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de MFN2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.001$). a amb respecte a NC, b amb respecte a HC).

Per tant, tot i que s'ha estudiat que les isoflavones indueixen la biogènesi mitocondrial per l'augment de PGC-1 α a través de l'activació de SIRT1 en les cèl·lules tubulars renals proximals. En el present estudi, els ratolins no van mostrar un augment de l'ADNmt en els diferents teixits tot i l'augment de SIRT1, AMPK α i PGC-1 α en el múscul. En el fetge hi ha un augment de SIRT1, porina i del complex I. Per tant, encara que no s'observen diferències en l'ADNmt si que hi ha una adaptació amb la ingesta de soja, ja que s'observa un augment de les proteïnes relacionades amb la biogènesi mitocondrial.

Finalment, es pot concloure que en termes generals s'observa que la suplementació amb soja indueix efectes principalment en el múscul i és possible que a causa d'aquests canvis s'observi una major sensibilitat a la insulina. No obstant, quan es manté una elevada ingesta energètica, els efectes de la soja en la sensibilitat a la insulina es veuen reduïts.

3.7. BCL2

Els resultats de BCL2 es mostren en la Figura 88. En el múscul s'observa un augment significatiu en el grup NC respecte els altres grups, tot i que els valors observats en els grups amb l'addició de soja són els mateixos que el Control. En el teixit adipós no s'observen diferències significatives entre grups, no obstant això, al fetge hi ha un augment en el grup NC+S, sent aquests valors superiors al Control.

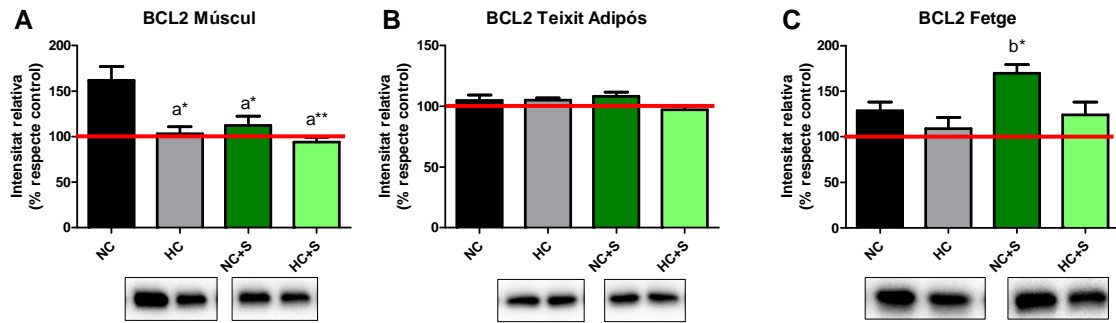


Figura 88. Quantificació de BCL2 després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de BCL2 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$, $p < 0.01$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

4. DANY OXIDATIU

4.1. DANY OXIDATIU PROTEIC DIRECTE

En la Figura 89 s'observa un augment significatiu en els nivells de SAG en els dos grups amb una ingesta de soja tant en el múscul com en el teixit adipós. En canvi, en el fetge no s'observen diferències significatives entre els grups.

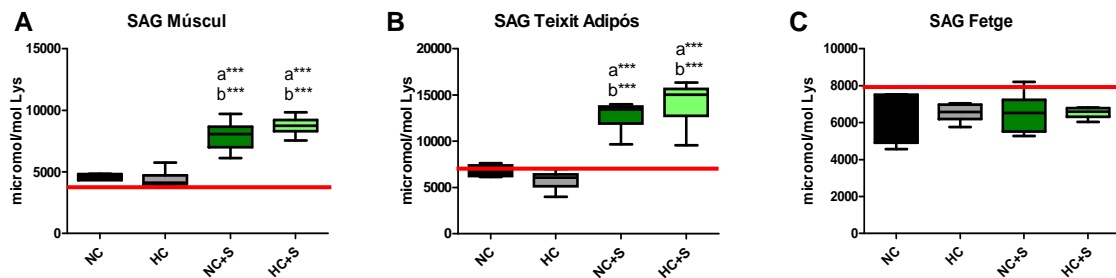


Figura 89. Nivells de semialdehid glutàmic (SAG) després de dos mesos de tractament amb soja.

Nivells de SAG (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($***p < 0.005$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

4.2. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICOXIDACIÓ

En el múscul s'observa una disminució significativa en els nivells de CEL en el grup NC+S respecte el grup NC (Figura 90). En els altres dos teixits no s'observen diferències significatives entre els grups.

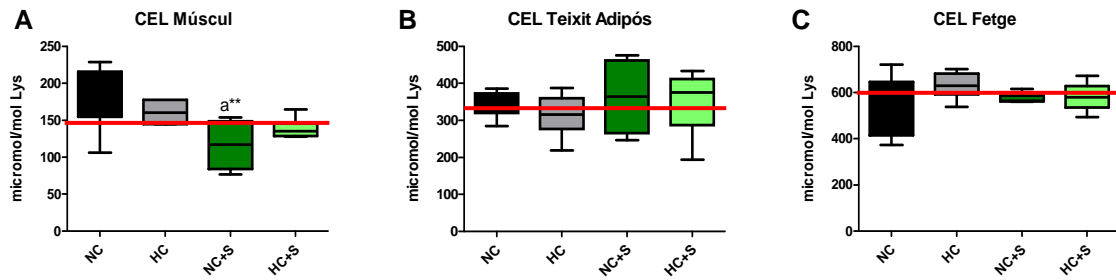


Figura 90. Nivells de Ne-(Carboxietil)lisina (CEL) després de dos mesos de tractament amb soja. Nivells de CEL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (^a p<0.01 a amb respecte NC).

4.3. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LIPOXIDACIÓ

No s'observen diferències significatives entre grups en els nivells de MDAL (Figura 91) en el teixit muscular. En el teixit adipós està significativament disminuït en els grups HC, NC+S i HC+S. En el fetge s'observa una disminució significativa en el grup NC+S respecte els grups NC i HC.

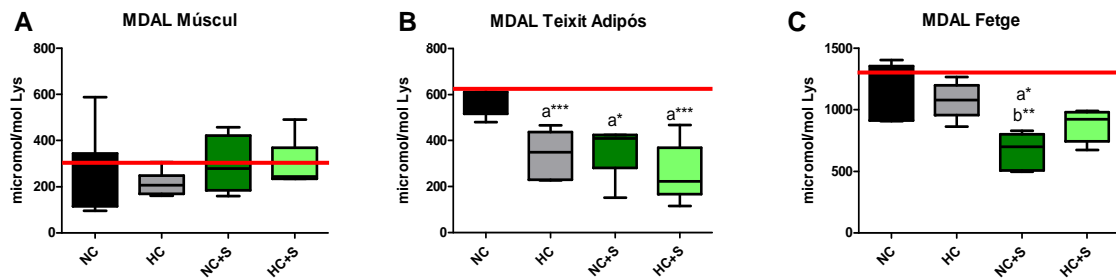


Figura 91. Nivells de malondialdehid-lisina (MDAL) després de dos mesos de tractament amb soja. Nivells de MDAL (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (^a p<0.05 ^{**} p<0.01 ^{***} p<0.005 a amb respecte NC, b amb respecte HC).

4.4. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE GLICO I LIPOXIDACIÓ

En la Figura 92 s'observa una disminució del dany per CML en els dos grups amb una ingesta de soja respecte NC i HC en el teixit muscular. En canvi en el teixit adipós i en el fetge hi ha un augment significatiu en els dos grups amb una ingesta de soja.

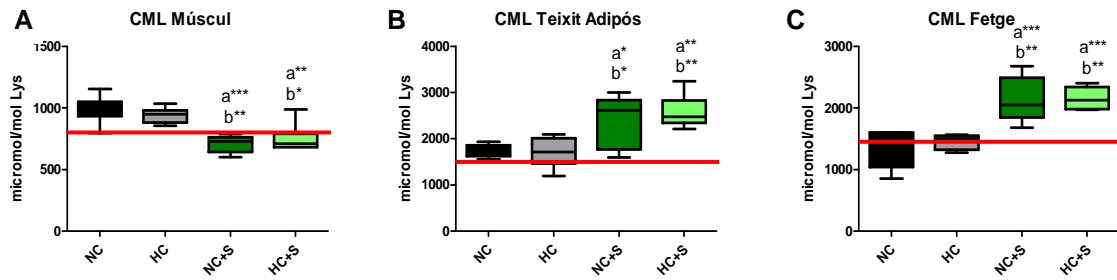


Figura 92. Nivells de Nε-(carboximetil)lisina (CML) després de dos mesos de tractament amb soja.

Nivells de CML (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $^{***} p < 0.01$ $^{****} p < 0.005$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

4.5. DANY OXIDATIU PROTEIC DERIVAT DE LA REACCIÓ DEL FUMARAT AMB LA CISTEÏNA

S'ha utilitzat el marcador 2-Succinyl-Cysteine (2SC), que deriva de la reacció del fumarat (del cicle de Krebs) amb la cisteïna. El 2SC pot ser un biomarcador útil de l'estrès mitocondrial a la diabetis ¹³⁸. En la Figura 93 no s'observen diferències entre els grups en els diferents teixits.

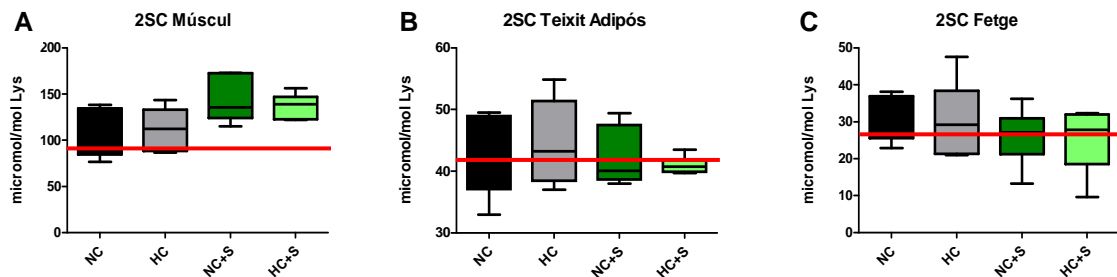


Figura 93. Nivells de 2-succinyl-cysteine (2SC) després de dos mesos de tractament amb soja.

Nivells de 2SC (micromol/mol Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. No s'observen diferències significatives entre grups en els diferents teixits.

Respecte el dany oxidatiu, s'observa un increment en els dos grups amb l'addició de soja en el marcador SAG en el múscul i en el teixit adipós i del marcador CML en el teixit adipós i en el fetge. En canvi, s'observa una disminució del dany en el marcador MDAL en el teixit adipós i en el fetge i en el marcador CML al múscul. Per tant, és necessari un estudi més complex de com la ingesta de soja afecta en els diferents marcadors de dany oxidatiu i així poder observar les repercussions clíniques. Respecte aquestes diferències entre els teixits i marcadors del dany oxidatiu hi ha estudis que han observat diferents efectes del consum de soja en l'estrès oxidatiu mesurat en el plasma i sèrum. Per exemple, un estudi que va indicar una millora de l'estrès oxidatiu i el control de la glucèmia en dones amb SM ³²⁵ i un altre en que les

isoflavones no van mostrar efecte en la reducció del dany oxidatiu en dones menopàusiques³²⁶.

Els resultats d'aquesta tesi suggereixen que el major grau de sensibilitat a la insulina pot estar relacionat amb l'increment en el dany oxidatiu. No obstant, l'excés energètic combinat amb la suplementació de soja, no agreuja el dany oxidatiu observat en el grup NC+S. Possiblement com s'ha mencionat anteriorment, l'efecte sensibilitzador de insulina de la soja es perd en part en les dietes hipercalòriques.

4.6. ENZIM ANTIOXIDANT SOD1

En la Figura 94 es mostren els resultats de la quantificació de SOD1. Respecte els resultats en el teixit muscular no s'observen diferències significatives entre grups, tot i que el grup HC+S tendeix a augmentar respecte HC, assolint així uns valors com el del Control (línia roja).

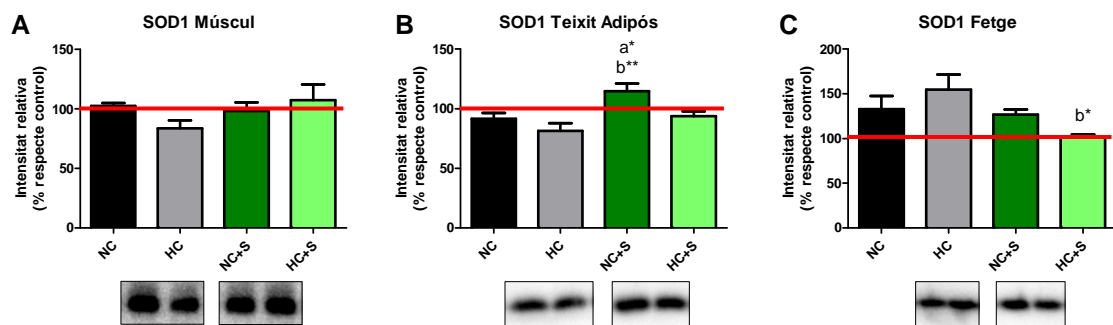


Figura 94. Quantificació de SOD1 després de dos mesos de tractament amb soja.

Quantificació de SOD1 per densitometria en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ a amb respecte NC i b amb respecte HC).

Respecte el teixit adipós s'observa un augment significatiu en el grup NC+S, sent els valors majors que el Control. En canvi en el fetge hi ha una disminució significativa en el grup HC+S respecte HC, tot i que els valors de HC+S són els mateixos que el Control.

5. CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL PLASMA

Tot i que hi ha estudis que han associat un efecte antioxidant a la soja^{324 338}, en el FRAP (Figura 95A) no s'observa un increment dels nivells respecte el Control, mostrant a més, un augment significatiu del grup HC respecte els altres grups.

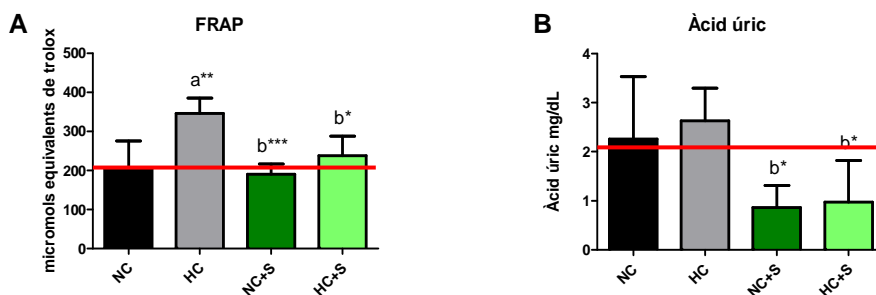


Figura 95. Capacitat antioxidant del plasma després de dos mesos de tractament amb soja.

Capacitat antioxidant pel mètode FRAP (micromols equivalents de trolox) del plasma (A) i determinació de l'àcid úric (mg/dL) del plasma (B). La línia roja indica el Control. Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ $p < 0.01$ $p < 0.001$. a amb respecte a NC i b amb respecte a HC).

En la Figura 95B s'observa una disminució de l'àcid úric en els dos grups amb una ingesta de soja, respecte aquesta disminució, un article indica que l'efecte de la proteïna de soja en l'àcid úric en plasma és variable, ja que van observar nivells menors en rates alimentades amb proteïna de soja, no obstant, en les rates obeses alimentades amb soja els nivells van ser majors ³³⁹. Tanmateix, a diferència dels resultats exposats hi ha un estudi en humans que indiquen que la proteïna de soja incrementa les concentracions d'àcid úric en el sèrum ³⁴⁰.

Un cop mesurat el FRAP i l'àcid úric, s'observa que no hi ha una correlació entre ells, ja que en els dos grups amb una addició de soja a la dieta hi ha una disminució de l'àcid úric respecte el Control però en la capacitat antioxidant tenen uns nivells semblants al Control. Per tant, es podria suggerir que la capacitat antioxidant observada en els dos grups amb una ingesta de soja és deguda a la ingesta de soja.

C. DISCUSSIÓ

La soja ha estat un element bàsic de la dieta asiàtica, juntament amb la baixa taxa de SM en aquesta regió, ha generat que sigui un aliment d'estudi i a més actualment també s'ha incorporat a la dieta occidental. Són amplis els estudis que indiquen els beneficis de la soja en la salut humana. Les propietats de la soja s'atribueixen a la gran complexitat de components que la formen, ja que és una font rica de proteïna vegetal, hidrats de carboni complexos, greixos poliinsaturats, fibres solubles i fitoestrògens (isoflavones). Respecte al metabolisme de la glucosa, estudis en animals indiquen que la soja millora el control glucèmic, disminueix els requeriments insulínics i incrementa la sensibilitat a la insulina ³⁰⁹⁻³¹².

No obstant, també és de gran importància avaluar els efectes beneficiosos o adversos de la soja en un context de dieta hipercalòrica, ja que és una de les principals característiques de l'estil de vida moderna. Tot i que s'ha informat en la literatura que el consum de soja té un efecte positiu sobre el metabolisme de la glucosa³³¹, aquesta relació en aquest capítol no es va observar de la mateixa manera en una dieta hipergrassa respecte a una dieta normocalòrica. Ja en un estudi anterior s'ha mostrat la falta d'efecte de la soja en el metabolisme de la glucosa en una dieta desequilibrada³²⁹ o un altre que indica que l'addició de soja en una dieta de cafeteria va ser insuficient per desfer els efectes nocius que aquest tipus de dieta causa a la salut³³². No obstant, s'observa una disminució de la RI en el grup amb l'addició de soja en el context de dieta hipercalòrica, encara que l'augment de pes és el mateix en els dos grups. Per tant, la soja millora en certa mesura la RI en un context de dieta hipercalòrica encara que no reverteixi del tot els nivells de glucosa com el Control.

Aquests efectes beneficiosos de la soja en el control glucèmic es podrien atribuir a l'absorció intestinal de glucosa o a canvis en el nombre de receptors d'insulina³⁴¹ que està en relació amb els resultats observats en l'augment de l'excreció de carbohidrats per la femta en el grup NC+S. A més, en aquest capítol s'ha observat que el grup amb ingesta de soja en un context de dieta hipercalòrica augmenta el GLUT4 i l'AMPK α respecte el grup HC en el teixit adipós. Per tant, mencionar que en la corba de glucosa, en un context de dieta normocalòrica la soja no confereix un valor afegit ja que s'observen els mateixos valors que el grup NC, però es pot suggerir que hi ha un major control de la glucosa ja que hi ha un increment del GLUT4 en el teixit adipós i de l'AMPK α en el múscul i teixit adipós. En canvi, respecte en un context de dieta hipercalòrica no reverteix completament la RI, mostrant solament certa protecció ja que els valors són menors respecte el grup HC i a més s'observa un augment del GLUT4 en el teixit adipós respecte el grup HC. A més l'augment del GLUT4 també podria estar relacionat amb la ingesta de les isoflavones presents en la soja que poden actuar com a estrògens ja que tenen l'estructura química similar amb les hormones animals. En aquest sentit i suposadament relacionant que l'augment d'estrògens comporta a un augment dels seus receptors, hi ha estudis que indiquen que els receptors d'estrògens α i β regulen GLUT4, mostrant que la transcripció de GLUT4 es redueix en cèl·lules que no tenen receptor d'estrògens β i que a més la disminució del metabolisme de la glucosa i l'augment de la inflamació en el teixit adipós amb una dieta hipergrassa en rates poden derivar-se d'una disminució significativa en l'expressió del receptor d'estrogen α ^{342,343}.

Al mesurar les diferents proteïnes relacionades amb el mitocondri, amb l'addició de la soja a la dieta s'observa una recuperació de la memòria metabòlica (observada en el grup NC) al complex IV, porina, SIRT1 i MFN2 en el múscul. En aquest sentit, amb l'addició de soja en un context de dieta normocalòrica, s'observa un augment de les proteïnes relacionades amb el mitocondri respecte el Control. Aquest efecte no es va contemplar en un context de dieta hipercalòrica amb soja i possiblement la falta de modificació mitocondrial sigui una conseqüència de la falta de sensibilitat a la insulina observada.

Respecte la biogènesi mitocondrial tot i que s'ha estudiat que les isoflavones promouen la biogènesi mitocondrial per l'increment de l'expressió de la proteïna PGC-1 α ³²² no s'observen canvis significatius en l'ADNmt. No obstant, si que s'observa un augment de PGC-1 α en el grup HC+S en el múscul i del grup NC+S al teixit adipós i de la proteïna SIRT1 en el múscul i fetge dels dos grups amb l'addició de soja. Respecte això, un estudi indica que el coumestrol, que és una isoflavona present en la soja, és capaç d'induir l'activitat de SIRT1; però a diferència dels resultats d'aquesta tesi, en aquest article van indicar una activació de SIRT1 i la posterior inducció de biogènesi mitocondrial i també un augment de la captació de glucosa ³⁴⁴. Però aquest comportament no es va observar en aquesta tesi.

S'ha observat que la soja millora l'estrès oxidatiu i el control de la glucèmia en dones d'edat avançada amb SM ³²⁵, no obstant, en aquest capítol s'observen resultats variables respecte el dany oxidatiu proteic en els diferents marcadors i teixits. Hi ha un augment de GSA en el múscul i teixit adipós i de CML en el teixit adipós i fetge en els dos grups amb l'addició de soja a la dieta. En canvi, hi ha una disminució en el marcador CML al múscul en els dos grups i de CEL al múscul en el grup NC+S i de la MDAL en el teixit adipós (tot i que els resultats són iguals que el grup HC) i en el fetge. Relacionat amb aquest augment del dany en el teixit adipós hi ha un augment de la SOD1. Per tant, aquest augment del dany podria ser per l'augment d'energia a la cèl·lula que pot propiciar a que hi hagi més dany oxidatiu. No obstant això, són necessaris més estudis per poder avaluar l'efecte de la soja sobre l'estrès oxidatiu.

Com a conclusió d'aquest capítol indicar que la soja en un context de dieta hipercalòrica no reverteix la sensibilitat a la insulina a uns nivells similars al Control, tot i que mostra beneficis en quan a la memòria metabòlica igual que el grup NC+S.

VI. DISCUSSIÓ

La SM que està caracteritzada per l'obesitat central, la hiperlipidèmia, la hipertensió i la RI, és una epidèmia creixent a tot el món. En els Estats Units al 2011 van ser diagnosticats el 34% de la població adulta ¹⁴, però encara més alarmant, és que nens de 8 anys ja presenten dislipidèmia i RI associada amb la SM ^{345,346}. Per tant, l'obesitat infantil és un dels greus problemes de salut pública del segle XXI, ja que la prevalença ha augmentat a un ritme alarmant i a més aquests nens tenen més probabilitats de romandre obesos a l'edat adulta i de desenvolupar SM.

En aquest sentit, el ràpid augment de l'obesitat es troba més aviat vinculat amb els canvis de l'estil de vida de la població, produïts pel consum de dietes hipercalòriques, riques en greixos i sucres simples i un estil de vida sedentari ¹⁴⁹ i que per tant, es requereixen noves estratègies terapèutiques i de prevenció. Els canvis en l'estil de vida, incloent la restricció calòrica i una major activitat física són les primeres línies de tractament per reduir la SM. Malgrat això, aquesta recomanació sovint és difícil d'aplicar en la població general i podria ser útil la incorporació de diferents nutrients a l'alimentació com a mesura compensatòria en un context de dieta hipercalòrica i que redueixi l'increment de la prevalença de la SM caracteritzada per aquest tipus d'ingesta alimentària.

En aquesta tesi juntament amb un règim de disminució del contingut calòric s'han estudiat possibles nutrients com a mesures terapèutiques en els ratolins que ja han contret una RI. Aquestes estratègies es practicaran tant en un context de dieta normocalòrica com en un context de dieta hipercalòrica. La primera estratègia és la simple reducció del contingut calòric de la dieta que s'ha aconseguit mitjançant l'adequació de la ingesta de greixos. L'adequació energètica és una mesura eficaç per promoure la pèrdua de pes i millorar l'estat de la SM ^{9,347}. La segona estratègia és l'addició d'oli de peix a la dieta, a més s'ha estudiat que l'omega-3 present en l'oli de peix millora les complicacions de la SM com per exemple que promou la sensibilitat a la insulina ³⁴⁸. La tercera estratègia és l'addició de fibra soluble a la dieta, hi ha una àmplia evidència que mostra que la ingesta de fibra soluble millora els paràmetres de la SM ⁹. I finalment, la última estratègia és l'addició d'una beguda de soja a la dieta dels ratolins, en aquest sentit s'ha estudiat que la soja augmenta la sensibilitat a la insulina i per tant, disminueix la RI ³¹¹. Respecte això, s'ha volgut avaluar l'efecte d'aquests nutrients en el metabolisme glucídic i com aquests canvis tenen una implicació en el mitocondri.

Un factor que s'ha tingut en compte en la realització d'aquest treball és que tot i que la disfunció mitocondrial és una característica comuna en pacients amb RI, no està clar si la disfunció mitocondrial és una causa o una conseqüència de la RI. En aquesta tesi s'observa com tot i la normalització de la sensibilitat a la insulina, hi ha proteïnes relacionades amb el mitocondri que no retornen a la normalitat. A més, l'addició dels nutrients en un context de dieta hipercalòrica millora la RI i els ratolins presenten diferents nivells de les proteïnes relacionades amb el mitocondri. Aquests resultats suggereixen que el mitocondri s'adapta als canvis produïts en la RI, i no que els canvis en el mitocondri predisposen a una millora en la RI.

Un altre factor que s'ha tingut en compte és la memòria metabòlica que es produeix a causa de les complicacions que es manifesten en la progressió de la hiperglucèmia i que persisteixen tot i la millora del control glucèmic ⁶⁵. Per tant, la comprensió d'aquests esdeveniments pot contribuir de manera significativa en les intervencions terapèutiques per prevenir, revertir o retardar els efectes nocius de la hiperglucèmia. S'han observat diversos canvis en les proteïnes relacionades amb el mitocondri i a més aquests canvis persisteixen tot i la reversió de la RI amb el tractament amb una dieta normocalòrica en el cas del teixit muscular, suggerint que existeix una memòria metabòlica en aquest teixit. No obstant, aquesta memòria no s'observa després del tractament amb els diferents nutrients, conferint per tant, un efecte modulador en el mitocondri.

Adicionalment, un dels primers factors estudiats ha estat l'anàlisi del pes dels ratolins al llarg de l'estudi. En la Figura 96A es descriu el pes final després de dos mesos amb els diferents tractaments. L'adequació energètica va mostrar una disminució de pes, encara que aquesta disminució no es va igualar en el grup Control. En general, la disminució de pes estaria relacionada amb la disminució del consum energètic en tots els grups amb una dieta normocalòrica respecte els grups amb una dieta hipercalòrica. A més, es va observar que el major grau de disminució de pes va ser en les primeres tres setmanes de tractament, mantenint-se posteriorment la disminució d'aquest pes. Això pot suggerir que després de tres setmanes hi ha una adaptació homeostàtica. Aquest comportament és semblant als programes de reducció de pes en humans on l'adaptació homeostàtica es duu a terme i és necessari la introducció de tractaments alternatius per a modificar aquesta homeòstasi. En termes generals, per a obtenir una disminució progressiva de pes seria recomanable introduir diversos canvis a la dieta per a modificar el metabolisme.

Amb l'addició dels diferents compostos bioactius en un context de dieta normocalòrica els ratolins mostren una major reducció respecte el tractament amb adequació energètica per si sola. A l'analitzar les calories ingerides respecte el grup NC, s'observa com tot i que hi ha una major disminució de pes en els grups NC+F i NC+S, la ingesta energètica és la mateixa en els tres grups. En aquest sentit, hi ha un altre factor relacionat amb la disminució de pes en els grups NC+S i NC+F que no vindria donat per la disminució de la ingesta calòrica i que es podria relacionar com s'ha observat amb l'augment de l'excreció de carbohidrats en la femta d'aquests dos grups respecte el grup NC.

En el context de dieta hipercalòrica, solament s'observa en el grup HC+F una tendència a disminuir el pes respecte el grup HC, tot i que la ingesta energètica és la mateixa en els dos grups. De la mateixa manera que en el grup NC+F, la disminució de pes vindria donada per l'augment de l'excreció de carbohidrats i suposadament per l'efecte dels AGCC i dels pèptids de sacietat. Tot i que no s'observen diferències en el pes respecte HC en els grups HC+OP i HC+S, aquests dos últims mostren una disminució de la ingesta energètica, suggerint que els canvis d'alimentació en aquests ratolins comporti a un canvi del metabolisme o que sigui un període d'adaptació en que els ratolins ingereixin una menor quantitat energètica sense alterar el pes corporal.

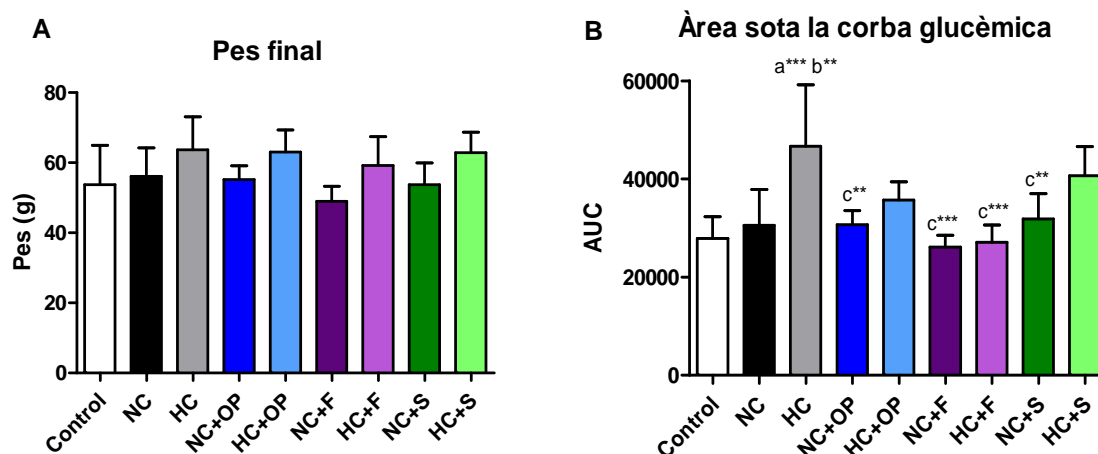


Figura 96. Pes i àrea sota la corba (AUC) després dels 2 mesos de tractament.

Pes (g) final dels ratolins (A) i AUC (B). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). a amb respecte a Control, b amb respecte NC i c amb respecte HC).

En relació amb l'àrea sota la corba glucèmica (Figura 96B), s'observa que els grups amb una dieta normocalòrica mostren el mateix patró de disminució de l'àrea sota la corba respecte el pes corporal. La mateixa observació, en relació al pes, es va trobar en els grups suplementats amb els compostos bioactius, suggerint que l'addició

de compostos bioactius en un context de dieta normocalòrica no mostren un valor afegit. No obstant, en el context de dieta hipercalòrica, no hi ha una relació entre el pes corporal i l'augment de la sensibilitat a la insulina. Aquest augment de la sensibilitat a la insulina podria estar mediat en part pels efectes dels diferents compostos. A més, els efectes positius es podrien atribuir en el cas de la fibra soluble a una disminució de l'absorció d'energia a l'intestí prim com s'ha observat en l'excreció de carbohidrats i consegüentment a una tendència a la disminució de pes. També els canvis observats podrien estar relacionats amb un augment dels productes de fermentació i dels pèptids de sacietat. Respecte els productes de fermentació, en un estudi amb ratolins van tractar la RI amb la suplementació de butirat, els efectes observats van ser a causa d'un augment de la despesa energètica i a una inducció de la funció mitocondrial ²⁹⁴. En el cas de la soja aquests efectes podrien ser per canvis en la quantitat de proteïna GLUT4 i per una disminució intestinal de carbohidrats. En el cas de l'omega-3 l'augment en la sensibilitat a la insulina podria ser per la supressió de la inflamació ¹⁷⁸ i per un augment de la capacitat d'emmagatzematge energètic, és a dir un augment de l'adipogènesi. En relació amb això s'ha estudiat que els omega-3 poden ser mediadors de l'expressió gènica a través dels PPARs i que controlen l'expressió dels gens implicats en el metabolisme dels lípids i la glucosa i l'adipogènesi ²¹³.

Respecte a la dinàmica mitocondrial, s'observen diferents canvis en l'ADNmt (Figura 97), sent possible induir biogènesi mitocondrial, específicament al múscul, mentre que al teixit adipós i fetge no es veuen afectats. En situacions de RI, s'observa en el múscul i en el teixit adipós una tendència a augmentar el nombre de mitocondris. No obstant, en el fetge el comportament és contrari a l'observat als altres teixits, mostrant el grup HC una reducció significativa respecte el Control. Aquestes diferències entre els teixits, podria ser a causa de les seves diferències metabòliques així com els seus mitocondris. Possiblement el fetge sigui més sensible als canvis de substrat energètic i aquesta tendència a l'augment en el múscul i teixit adipós es doni en uns estadis inicials i que en la progressió de la RI variï, com ja s'ha observat anteriorment un augment de la biogènesi mitocondrial de manera primerenca i transitòria que es perd en el progrés de la RI ³².

Respecte als tractaments, en el múscul hi ha un augment de l'ADNmt en els dos grups amb una addició de fibra soluble a la dieta que juntament amb un augment de les proteïnes relacionades amb el mitocondri, es podria suggerir que hi ha un augment de la biogènesi mitocondrial. No obstant, en el fetge s'observa l'efecte contrari, havent per tant, un comportament diferent depenent el teixit analitzat, com

s'ha comentat anteriorment. En relació amb aquests resultats, hi ha un estudi en rates que se'ls hi va incloure a la dieta fibra soluble i van mostrar un augment de l'AMPK α tant en el múscul com en el fetge, però solament un augment de PGC-1 α i PPAR δ en el múscul, suggerint que en el múscul i no en el fetge, hi ha un augment de la biogènesi mitocondrial²⁹⁶.

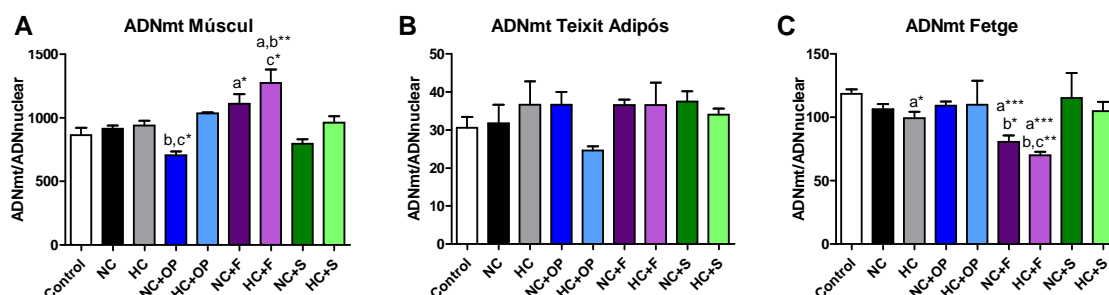


Figura 97. Avaluació de l'ADNmt després dels dos mesos de tractament.

Avaluació de l'ADNmt en el múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). La quantificació de l'ADNmt es realitza mitjançant el marcador Cytb i es normalitza i es determina segons l'amplificació del gen Actb utilitzant el mètode comparatiu ($2^{-\Delta Ct}$). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a Control, b amb respecte NC i c amb respecte HC).

Respecte el dany oxidatiu proteic, s'ha seleccionat el marcador CML (Figura 98) per discutir el comportament entre els diferents grups, ja que és un marcador mixt derivat de l'oxidació de carbohidrats i de lípids. A la inducció de la RI (grup HC), s'observa un comportament diferent respecte el teixit analitzat, mostrant el mateix patró de comportament obtingut a l'anàlisi de l'ADNmt. En aquest sentit, en el múscul i teixit adipós hi ha una tendència a augmentar els nivells de CML i ADNmt, mentre que en el fetge succeeix el contrari. A més, aquests resultats ens indiquen, que respecte el grup NC, tot i que hi ha una reversió de la RI, es continua observant el mateix grau de dany oxidatiu observat en el grup HC, indicant l'existència d'una memòria metabòlica en el grup NC.

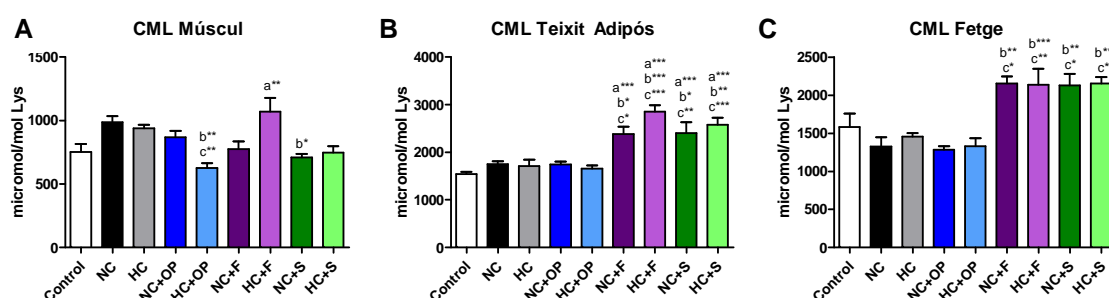


Figura 98. Nivells de CML després dels dos mesos de tractament.

Nivells de CML (micromol/ml Lys) en múscul (A), teixit adipós (B) i fetge (C). Els valors marcats mostren diferències significatives entre els grups ($p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$. a amb respecte a Control, b amb respecte NC i c amb respecte HC).

Cal destacar que tot i els beneficis observats amb l'addició de fibra soluble i soja en la RI i el mitocondri, hi ha un augment del dany oxidatiu proteic. Aquest increment podria estar relacionat amb un augment d'entrada d'energia a la cèl·lula i/o la modificació dels complexos mitocondrials. Respecte el dany oxidatiu en el grup NC+OP no s'observa un augment del dany oxidatiu proteic i fins i tot en el grup HC+OP s'observen disminucions en alguns marcadors, que podria ser a causa d'un augment de l'adipogènesi en aquest grup. Per tant, en aquest sentit s'observen uns resultats més favorables amb l'addició l'oli de peix que de fibra soluble. Això suggereix que el nutrient que mostra major benefici en els diferents aspectes analitzats és l'omega-3, ja que modifica la memòria metabòlica produïda per un RI, millora alguns paràmetres relacionats amb el mitocondri i no s'observa un augment del dany oxidatiu proteic o fins i tot s'observa una disminució en el grup amb una dieta HC. No obstant, en aquest treball no es descriu els efectes a llarg termini d'aquesta suplementació sense la correcció de la ingesta energètica, el qual és necessari per determinar la seguretat d'aquests components.

També és important mencionar, que existeix una gran interacció entre els diferents òrgans involucrats en l'homeòstasi de la glucosa. En la Figura 99 es poden observar els teixits i òrgans implicats en l'homeòstasi de la glucosa i com aquest és un

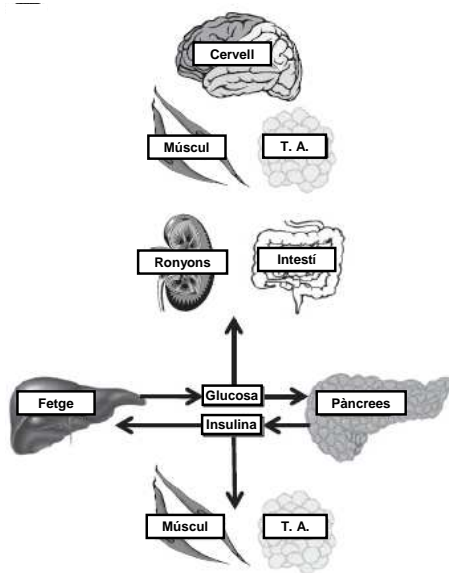


Figura 99. Òrgans i teixits involucrats en l'homeòstasi de la glucosa.

Figura adaptada de Hill et al.³⁵⁴

procés de retroalimentació complex. A més, la sensibilitat a la insulina pot variar en els diferents òrgans i teixits. Respecte això, indicar que els tres teixit analitzats mostren un comportament diferent en la progressió de la RI i en el seu tractament. Respecte al fetge, hi ha una bona adaptació als canvis en el metabolisme, ja que en general s'observen poques diferències en els paràmetres analitzats. No obstant, el teixit adipós sembla ser més flexible als canvis en el metabolisme. Finalment, es suggereix que el múscul és el teixit analitzat més resistent a canvis en el metabolisme energètic, suggerint una major preservació de la memòria metabòlica.

L'enfocament d'aquesta tesi il·lustra el potencial ús d'una intervenció dietètica per reduir els riscos per a la salut de la SM i les troballes presentades poden servir com una evidència per donar suport a un tractament a través de la dieta. A més, es

podria suggerir que en conjunt aquestes estratègies podrien tenir efectes sinèrgics en la patologia de la SM, com l'augment de la sensibilitat a la insulina, disminució en els paràmetres lipídics o regulació en la funció mitocondrial. Per tant, seria interessant poder estudiar l'efecte dels tres compostos de forma simultània o successivament, i poder trobar una dosi adequada perquè els subjectes amb SM tinguin una millora.

Respecte els efectes sinèrgics dels diferents nutrients estudiats, hi ha evidència de dietes que els engloba i que es relacionen amb una disminució de la SM. Per exemple, la dieta mediterrània que es caracteritza per un alt consum de verdures, fruites, oli d'oliva, llegums i peix, un moderat consum d'alcohol i un baix consum de carn vermella, carn processada, carbohidrats refinats i productes làctics sencers és beneficiosa per a les persones amb risc de SM o individus amb SM ja establert ^{349,350}. En relació amb això, la dieta mediterrània aporta fibra i omega-3, components estudiats en aquesta tesi. Nombrar també que el Japó representa un dels països amb menor incidència de SM ³⁵¹, per exemple s'ha estudiat que els homes japonesos tenien un menor risc de SM ja que es va observar major adherència a les directrius de l'American Heart Association Diet, que promou el consum de dietes riques en fruites, verdures, grans sencers, peix blau, mentre que limita el greix total, greix saturat, colesterol de la dieta, sucres afegits, sodi i la ingesta excessiva d'alcohol ³⁵². La dieta Japonesa aporta fibra, omega-3 i soja, components estudiats en aquesta tesi.

A més un altre factor a tenir en compte és que encara que la reducció calòrica segueix sent el tractament d'elecció per la pèrdua de pes, hi ha un escàs èxit a llarg termini. A més, els diversos factors que poden contribuir en la recuperació del pes després de la pèrdua no s'han aclarit completament ³⁵³. S'hipotetitza que hi ha diversos factors que poden combinar-se per crear una disposició biològica que fomenti el manteniment d'un pes corporal adequat a llarg termini. Per tant, és recomanable analitzar si les intervencions estudiades en aquesta tesi poden ser eines per contrarestar aquests mecanismes biològics i així obtenir un manteniment de pes a llarg termini. Com a conclusió, mencionar que la simple reducció energètica ja millora els paràmetres relacionats amb la SM, no obstant l'addició dels nutrients estudiats milloren alguns paràmetres relacionats amb la memòria metabòlica i la RI en un context de dieta hipercalòrica. Per tant, encara que les estratègies dietètiques utilitzades tenen diferents graus d'eficàcia en els paràmetres mesurats, els resultats presentats proporcionen una evidència en la capacitat d'adaptació al metabolisme dels diferents teixits analitzats i que els efectes de les dietes hipercalòriques en el metabolisme poden ser reversibles.

VII. CONCLUSIONS

1. CONCLUSIÓ GENERAL

De forma general es pot concloure que els efectes produïts en el mitocondri i possiblement en el metabolisme per les dietes hipercalòriques en situacions de RI poden ser revertits. La suplementació nutricional d'omega-3, fibra soluble i soja produeixen canvis en la sensibilitat a la insulina, en el metabolisme energètic i en la memòria metabòlica quan són addicionats tant en dietes normocalòriques com en hipercalòriques en el tractament de la síndrome metabòlica. En el tractament amb una dieta normocalòrica, l'addició de fibra soluble, omega-3 i soja mostren els mateixos efectes que la dieta normocalòrica per si sola. Mentre que en el context de dieta hipercalòrica, l'addició fibra soluble, omega-3 i soja milloren els paràmetres de resistència a la insulina, sent aquest efecte més pronunciat en el cas de la fibra soluble. En quan a la conservació de la memòria metabòlica s'observen diferents resultats segons el teixit analitzat, sent el teixit muscular l'òrgan que la manté. En relació amb els tractaments utilitzats, la fibra soluble, omega-3 i soja tenen la capacitat de revertir la memòria metabòlica, evidenciat per la normalització de les proteïnes relacionades amb el mitocondri, sent la fibra soluble, el compost que té major capacitat.

2. CONCLUSIONS ESPECÍFIQUES

1.- No s'observa, un valor afegit amb l'addició d'omega-3 i soja en la sensibilitat a la insulina en una dieta normocalòrica, no obstant, la fibra soluble mostra una major sensibilitat a la insulina. En un context de dieta hipercalòrica l'omega-3 i fibra soluble reverteixen la resistència a la insulina a uns nivells semblants al Control i la soja tendeix a disminuir els valors respecte el grup HC. No hi ha una relació entre l'augment de la sensibilitat a la insulina i la fructosamina i GLUT4 en el teixit muscular i adipós i de GLUT2 en el fetge. No s'evidencia una relació entre l'augment de la sensibilitat a la insulina i l'AMPK α a diferència de la fibra soluble que en ambdós tipus de dieta hi ha un augment en el teixit muscular, adipós i hepàtic.

2.- En un context de dieta hipercalòrica, la fibra soluble redueix la velocitat d'increment de pes, no observant-se aquest efecte amb l'addició de soja i omega-3. En un context de dieta normocalòrica, la ingesta de fibra soluble mostra una disminució de pes més pronunciada que els altres grups. L'addició d'omega-3, fibra soluble i soja no modifiquen la ingesta dietètica, suggerint en el cas de l'omega-3 i soja que el canvi de

pes està relacionat amb la ingesta energètica. En canvi, amb l'addició de fibra soluble s'observa una disminució de pes major respecte els altres grups tot i la mateixa ingesta energètica.

3.- Respecte el metabolisme lipídic s'observa una disminució del colesterol total en els grups amb l'addició d'omega-3, fibra soluble i soja. En la medició de LDL s'observa una tendència cap a la disminució en els grups amb l'addició de fibra i omega-3 tant en un context de dieta normocalòrica com hipercalòrica. Aquesta disminució és significativa en el grup amb l'addició d'omega-3 en un context de dieta normocalòrica. Respecte HDL s'observa un augment significatiu en els grups amb una addició d'omega-3 i soja en un context de dieta hipercalòrica i en els triglicèrids no s'observen diferències significatives entre els grups.

4.- Respecte l'ADNmt solament s'observen canvis significatius amb la ingesta de fibra soluble, havent un augment en el teixit muscular i una disminució en el teixit hepàtic. En relació amb les proteïnes relacionades amb el mitocondri s'observen canvis amb l'addició de fibra soluble i omega-3 tant en una dieta normocalòrica com hipercalòrica, en canvi, amb l'addició de soja aquests efectes solament s'observen en el grup amb una dieta normocalòrica.

5.- Respecte els canvis en el dany oxidatiu proteic, no s'observen diferències significatives en l'increment del dany oxidatiu amb unes dietes hipercalòriques en comparació amb les normocalòriques. Hi va haver un augment del dany oxidatiu en alguns marcadors proteics amb la ingesta de fibra soluble i soja, aquest augment podria estar relacionat amb l'augment de SOD1 que s'observa en el teixit adipós en aquests grups. Amb la ingesta d'omega-3 en un context de dieta hipercalòrica s'observen disminucions en diferents marcadors de dany oxidatiu proteic, respecte SOD1 s'observa una disminució significativa en el context de dieta normocalòrica.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Eckel, R. H., Grundy, S. M. & Zimmet, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415–28 (2005).
2. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–1607 (1988).
3. who_ncd_ncs_99.2.pdf.
<http://whqlibdoc.who.int/hq/1999/who_ncd_ncs_99.2.pdf>
4. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486–97 (2001).
5. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome.
http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf. at
<http://www.idf.org/webdata/docs/MetS_def_update2006.pdf>
6. Unger, R. H. Lipotoxic diseases. *Annu. Rev. Med.* **53**, 319–36 (2002).
7. Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P. & Garg, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* **111**, 1448–54 (2005).
8. Cornier, M.-A. *et al.* The metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **29**, 777–822 (2008).
9. Andersen, C. J. & Fernandez, M. L. Dietary strategies to reduce metabolic syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 241–54 (2013).
10. Cankurtaran, M. *et al.* Prevalence and correlates of metabolic syndrome (MS) in older adults. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **42**, 35–45 (2006).
11. Ford, E. S., Giles, W. H. & Mokdad, A. H. Increasing Prevalence of the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. *Diabetes Care* **27**, 2444–2449 (2004).
12. Zimmet, P., Alberti, K. G. & Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **414**, 782–7 (2001).
13. Levesque, J. & Lamarche, B. The metabolic syndrome: definitions, prevalence and management. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **1**, 100–8 (2008).
14. Mozumdar, A. & Liguori, G. Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006. *Diabetes Care* **34**, 216–9 (2011).
15. Álvarez León, E. E., Ribas Barba, L. & Serra Majem, L. Prevalencia del síndrome metabólico en la población de la Comunidad Canaria. *Med. Clin. (Barc)*. **120**, 172–174 (2003).
16. Lorenzo, C. *et al.* Central adiposity determines prevalence differences of the metabolic syndrome. *Obes. Res.* **11**, 1480–1487 (2003).

17. Aranceta, J. *et al.* Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. *Med. Clin. (Barc)*. **120**, 608–612 (2003).
18. Anderson, P. J. *et al.* Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25**, 1782–8 (2001).
19. Ginsberg, H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* **106**, 453–458 (2000).
20. Lebovitz, H. E. Insulin resistance--a common link between type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Diabetes. Obes. Metab.* **8**, 237–49 (2006).
21. Reaven, G. Insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease: the end of the beginning. *Circulation* **112**, 3030–2 (2005).
22. Uwaifo, G. I. & Ratner, R. E. The roles of insulin resistance, hyperinsulinemia, and thiazolidinediones in cardiovascular disease. *Am. J. Med.* **115**, 12–19 (2003).
23. Laclaustra Gimeno, M., Bergua Martínez, C., Pascual Calleja, I. & Casasnovas Lenguas, J. A. Síndrome metabólico. Concepto y fisiopatología. *Rev. Española Cardiol. Supl.* **5**, 3D–10D (2005).
24. Lann, D. & LeRoith, D. Insulin resistance as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Med. Clin. North Am.* **91**, 1063–77, viii (2007).
25. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002 (2008).
26. Jensen, M. D., Caruso, M., Heiling, V. & Miles, J. M. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* **38**, 1595–1601 (1989).
27. Boden, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes. Obes.* **18**, 139–43 (2011).
28. Venturini, D. *et al.* Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)*. **20**, 2361–6 (2012).
29. Furukawa, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* **114**, 1752–1761 (2004).
30. Matsuzawa-Nagata, N. *et al.* Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. **57**, 1071–7 (2008).
31. Goodpaster, B. H. Mitochondrial deficiency is associated with insulin resistance. *Diabetes* **62**, 1032–5 (2013).
32. Holloszy, J. O. “Deficiency” of mitochondria in muscle does not cause insulin resistance. *Diabetes* **62**, 1036–40 (2013).

33. Bonnard, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 789–800 (2008).
34. Martin, S. D. & McGee, S. L. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* (2013). doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.019
35. Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**, (1967).
36. Harris, D. A. & Das, A. M. Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* **280**, 561–573 (1991).
37. Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J. & Carreras, M. C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1150–80 (2012).
38. Tait, S. W. G. & Green, D. R. Mitochondria and cell signalling. *J. Cell Sci.* **125**, 807–15 (2012).
39. Kim, J. Y., Hickner, R. C., Cortright, R. L., Dohm, G. L. & Houmard, J. A. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **279**, (2000).
40. Petersen, K. F., Dufour, S., Befroy, D., Garcia, R. & Shulman, G. I. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N. Engl. J. Med.* **350**, 664–71 (2004).
41. Chicco, A. J. & Sparagna, G. C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C33–44 (2007).
42. Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–23 (2004).
43. Brehm, A. Increased Lipid Availability Impairs Insulin-Stimulated ATP Synthesis in Human Skeletal Muscle. *Diabetes* **55**, 136–140 (2006).
44. Kelley, D. E., Mokan, M., Simoneau, J. A. & Mandarino, L. J. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* **92**, 91–98 (1993).
45. Kelley, D. E. & Simoneau, J. A. Impaired free fatty acid utilization by skeletal muscle in non-insulin- dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* **94**, 2349–2356 (1994).
46. Simoneau, J. A. & Kelley, D. E. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J. Appl. Physiol.* **83**, 166–171 (1997).
47. Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V. & Ritov, V. B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944–2950 (2002).

48. He, J., Watkins, S. & Kelley, D. E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. *Diabetes* **50**, 817–823 (2001).
49. Mogensen, M. *et al.* Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **56**, 1592–9 (2007).
50. Choo, H.-J. *et al.* Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* **49**, 784–91 (2006).
51. Morino, K. *et al.* Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J. Clin. Invest.* **115**, 3587–93 (2005).
52. Stump, C. S., Short, K. R., Bigelow, M. L., Schimke, J. M. & Nair, K. S. Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7996–8001 (2003).
53. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–73 (2003).
54. Patti, M. E. *et al.* Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8466–71 (2003).
55. Sparks, L. M. *et al.* A High-Fat Diet Coordinately Downregulates Genes Required for Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Skeletal Muscle. *Diabetes* **54**, 1926–1933 (2005).
56. Turner, N. *et al.* Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* **56**, 2085–92 (2007).
57. Hancock, C. R. *et al.* High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7815–20 (2008).
58. Garcia-Roves, P. *et al.* Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10709–13 (2007).
59. Sreekumar, R. *et al.* Impact of high-fat diet and antioxidant supplement on mitochondrial functions and gene transcripts in rat muscle. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **282**, (2002).
60. Boudierba, S. *et al.* Hepatic mitochondrial alterations and increased oxidative stress in nutritional diabetes-prone *Psammomys obesus* model. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 430176 (2012).
61. Raffaella, C. *et al.* Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)*. **16**, 958–64 (2008).

62. Preis, S. R. *et al.* Abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue and insulin resistance in the Framingham heart study. *Obesity (Silver Spring)*. **18**, 2191–8 (2010).
63. Laye, M. J. *et al.* Changes in visceral adipose tissue mitochondrial content with type 2 diabetes and daily voluntary wheel running in OLETF rats. *J. Physiol.* **587**, 3729–39 (2009).
64. Sutherland, L. N., Capozzi, L. C., Turchinsky, N. J., Bell, R. C. & Wright, D. C. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E1076–83 (2008).
65. Keating, S. T. & El-Osta, A. Epigenetic changes in diabetes. *Clin. Genet.* **84**, 1–10 (2013).
66. Madsen-Bouterse, S. A., Mohammad, G., Kanwar, M. & Kowluru, R. A. Role of mitochondrial DNA damage in the development of diabetic retinopathy, and the metabolic memory phenomenon associated with its progression. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 797–805 (2010).
67. Ceriello, A. La “memoria metabólica” inducida por la hiperglucemia: el nuevo reto en la prevención de la enfermedad cardiovascular en la diabetes. *Rev. Española Cardiol. Supl.* **8**, 12C–18C (2008).
68. Setchell, K. D. R. & Cassidy, A. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. in *J. Nutr.* **129**, (1999).
69. Programa NUSA. Nutrición y Salud. at <http://www.nusa.es/wp-content/uploads/2009/02/Fibra_aliment.pdf>
70. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO Food Nutr. Pap.* **91**, 1–166 (2010).
71. Benzie, I. F. & Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–6 (1996).
72. Englyst, H. N. & Cummings, J. H. Improved method for measurement of dietary fiber as non-starch polysaccharides in plant foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **71**, 808–814 (1988).
73. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
74. Samuel, V. T. & Shulman, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852–71 (2012).
75. Peterson, A. D. & Baumgardt, B. R. Food and energy intake of rats fed diets varying in energy concentration and density. *J. Nutr.* **101**, 1057–1067 (1971).

76. Sampey, B. P. *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)*. **19**, 1109–17 (2011).
77. Carpenter, K., Strohacker, K. & McFarlin, B. Considerations to maximize fat mass gain in a mouse model of diet-induced weight gain. *Lab. Anim.* **47**, 266–273 (2013).
78. Armbruster, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin. Chem.* **33**, 2153–2163 (1987).
79. MacQueen, H. A. *et al.* Deleterious effects of a cafeteria diet on the livers of nonobese rats. *Nutr. Res.* **27**, 38–47 (2007).
80. Kirchner, H. *et al.* Caloric restriction chronically impairs metabolic programming in mice. *Diabetes* **61**, 2734–42 (2012).
81. Muurling, M. *et al.* A low-fat diet has a higher potential than energy restriction to improve high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Metabolism* **51**, 695–701 (2002).
82. Mueckler, M. & Thorens, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* **34**, 121–38 (2013).
83. Bryant, N. J., Govers, R. & James, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 267–77 (2002).
84. Zierath, J. R. *et al.* Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. *Diabetologia* **39**, 1180–1189 (1996).
85. Shepherd, P. R. *et al.* Adipose cell hyperplasia and enhanced glucose disposal in transgenic mice overexpressing GLUT4 selectively in adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **268**, 22243–22246 (1993).
86. Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* **1**, 15–25 (2005).
87. Hardie, D. G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology* **144**, 5179–83 (2003).
88. Hardie, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 774–85 (2007).
89. Towler, M. C. & Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ. Res.* **100**, 328–41 (2007).
90. Zhang, B. B., Zhou, G. & Li, C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab.* **9**, 407–16 (2009).
91. McGee, S. L. *et al.* AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* **57**, 860–7 (2008).

92. Hulver, M. W. & Lynis Dohm, G. The molecular mechanism linking muscle fat accumulation to insulin resistance. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 375–380 (2004).
93. Eckardt, K., Taube, A. & Eckel, J. Obesity-associated insulin resistance in skeletal muscle: role of lipid accumulation and physical inactivity. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **12**, 163–72 (2011).
94. Begrich, K., Igoudjil, A., Pessayre, D. & Fromenty, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* **6**, 1–28 (2006).
95. Nicolson, G. L. Metabolic syndrome and mitochondrial function: molecular replacement and antioxidant supplements to prevent membrane peroxidation and restore mitochondrial function. *J. Cell. Biochem.* **100**, 1352–69 (2007).
96. Liesa, M. & Shirihai, O. S. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab.* **17**, 491–506 (2013).
97. Hoehn, K. L. *et al.* Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17787–92 (2009).
98. Martin, S. D., Morrison, S., Konstantopoulos, N. & McGee, S. L. Mitochondrial dysfunction has divergent, cell type-dependent effects on insulin action. *Mol. Metab.* (2014). doi:10.1016/j.molmet.2014.02.001
99. Herrmann, J. M. & Neupert, W. Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 210–214 (2000).
100. Williams, R. S. Mitochondrial gene expression in mammalian striated muscle. Evidence that variation in gene dosage is the major regulatory event. *J. Biol. Chem.* **261**, 12390–12394 (1986).
101. Lemasters, J. J. & Holmuhamedov, E. Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondrial governor--thinking outside the box. *Biochim. Biophys. Acta* **1762**, 181–90 (2006).
102. Wallace, D. C. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* (80-.). **283**, 1482–1488 (1999).
103. Lanza, I. R. *et al.* Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E1391–403 (2013).
104. Hempenstall, S., Page, M. M., Wallen, K. R. & Selman, C. Dietary restriction increases skeletal muscle mitochondrial respiration but not mitochondrial content in C57BL/6 mice. *Mech. Ageing Dev.* **133**, 37–45 (2012).
105. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–24 (1999).
106. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* **25**, 1895–908 (2011).

107. Law, I. K. M. *et al.* Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics* **9**, 2444–56 (2009).
108. Suwa, M., Nakano, H. & Kumagai, S. Effects of chronic AICAR treatment on fiber composition, enzyme activity, UCP3, and PGC-1 in rat muscles. *J. Appl. Physiol.* **95**, 960–968 (2003).
109. Zong, H. *et al.* AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15983–7 (2002).
110. Matejkova, O. *et al.* Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat. *FEBS Lett.* **569**, 245–8 (2004).
111. Gaidhu, M. P. *et al.* Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *J. Lipid Res.* **50**, 704–15 (2009).
112. Gerhart-Hines, Z. *et al.* Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* **26**, 1913–23 (2007).
113. Rodgers, J. T. *et al.* Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* **434**, 113–8 (2005).
114. Rodgers, J. T. & Puigserver, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12861–6 (2007).
115. Picard, F. *et al.* Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- γ . *Nature* **429**, 771–6 (2004).
116. Nisoli, E. & Carruba, M. O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 2855–62 (2006).
117. Sun, C. *et al.* SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab.* **6**, 307–19 (2007).
118. Chen, D. *et al.* Tissue-specific regulation of SIRT1 by calorie restriction. *Genes Dev.* **22**, 1753–7 (2008).
119. Zechner, C. *et al.* Total skeletal muscle PGC-1 deficiency uncouples mitochondrial derangements from fiber type determination and insulin sensitivity. *Cell Metab.* **12**, 633–42 (2010).
120. Bach, D. *et al.* iMitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J. Biol. Chem.* **278**, 17190–7 (2003).
121. Hernández-Alvarez, M. I. *et al.* Subjects with early-onset type 2 diabetes show defective activation of the skeletal muscle PGC-1 α /Mitofusin-2 regulatory pathway in response to physical activity. *Diabetes Care* **33**, 645–51 (2010).

122. Toledo, F. G. S., Watkins, S. & Kelley, D. E. Changes induced by physical activity and weight loss in the morphology of intermyofibrillar mitochondria in obese men and women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 3224–7 (2006).
123. Bach, D. *et al.* Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2A Gene, in Human Skeletal Muscle: Effects of Type 2 Diabetes, Obesity, Weight Loss, and the Regulatory Role of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6. *Diabetes* **54**, 2685–2693 (2005).
124. Galluzzi, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 780–8 (2012).
125. Reed, J. C. Warner-Lambert/Parke Davis award lecture: Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* **157**, 1415–1430 (2000).
126. Farrugia, G. & Balzan, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Front. Oncol.* **2**, 64 (2012).
127. Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. & Ros, J. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 27393–8 (2000).
128. Naudi, A. *et al.* Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. *Exp. Diabetes Res.* **2012**, 696215 (2012).
129. Goodarzi, M. T., Navidi, A. A., Rezaei, M. & Babahmadi-Rezaei, H. Oxidative damage to DNA and lipids: correlation with protein glycation in patients with type 1 diabetes. *J. Clin. Lab. Anal.* **24**, 72–6 (2010).
130. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 749–62 (2010).
131. Cao, K. *et al.* Hydroxytyrosol prevents diet-induced metabolic syndrome and attenuates mitochondrial abnormalities in obese mice. *Free Radic. Biol. Med.* **67**, 396–407 (2014).
132. Pamplona, R. & Barja, G. Mitochondrial oxidative stress, aging and caloric restriction: the protein and methionine connection. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 496–508 (2006).
133. Requena, J. R., Chao, C. C., Levine, R. L. & Stadtman, E. R. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 69–74 (2001).
134. Workeneh, B. & Bajaj, M. The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2239–44 (2013).
135. Ahmed, M. U., Frye, E. B., Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. N(ε)-(Carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **324**, 565–570 (1997).

136. Shah, G., Pinnas, J. L., Lung, C. C., Mahmoud, S. & Mooradian, A. D. Tissue-specific distribution of malondialdehyde modified proteins in diabetes mellitus. *Life Sci.* **55**, 1343–9 (1994).
137. Alderson, N. L. *et al.* S-(2-Succinyl)cysteine: a novel chemical modification of tissue proteins by a Krebs cycle intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* **450**, 1–8 (2006).
138. Blatnik, M., Frizzell, N., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes: formation of S-(2-succinyl)cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress. *Diabetes* **57**, 41–9 (2008).
139. Frizzell, N., Lima, M. & Baynes, J. W. Succination of proteins in diabetes. *Free Radic. Res.* **45**, 101–9 (2011).
140. Thomas, S. A., Storey, K. B., Baynes, J. W. & Frizzell, N. Tissue distribution of S-(2-succino)cysteine (2SC), a biomarker of mitochondrial stress in obesity and diabetes. *Obesity (Silver Spring)*. **20**, 263–9 (2012).
141. Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 1583–606 (2011).
142. Okado-Matsumoto, A. & Fridovich, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 38388–93 (2001).
143. Chen, X. A strategy for the ubiquitous overexpression of human catalase and CuZn superoxide dismutase genes in transgenic mice. *Mech. Ageing Dev.* **124**, 219–227 (2003).
144. Zaken, V., Kohen, R. & Ornoy, A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* **64**, 33–44 (2001).
145. Tinahones, F. J. *et al.* Oxidative stress in severely obese persons is greater in those with insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)*. **17**, 240–6 (2009).
146. Liu, Y. *et al.* Oxidative damage associated with obesity is prevented by overexpression of CuZn- or Mn-superoxide dismutase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 78–83 (2013).
147. Stoian, I. *et al.* Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *J. Int. Med. Res.* **40**, 709–716 (2012).
148. L, S. & F, B. Relevance of apple polyphenols as antioxidants in human plasma: contrasting in vitro and in vivo effects. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 201–211 (2003).
149. Scoaris, C. R. *et al.* Effects of cafeteria diet on the jejunum in sedentary and physically trained rats. *Nutrition* **26**, 312–20 (2010).

150. Chiavaroli, V. *et al.* Weight loss in obese prepubertal children: the influence of insulin resistance. *Endocr. Res.* **38**, 48–57 (2013).
151. Isganaitis, E. & Lustig, R. H. Fast food, central nervous system insulin resistance, and obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2451–62 (2005).
152. Misu, H. *et al.* Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **50**, 268–77 (2007).
153. Rutter, G. A. Diabetes: The importance of the liver. *Curr. Biol.* **10**, R736–R738 (2000).
154. Crunkhorn, S. *et al.* Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 15439–50 (2007).
155. Miller, W. C., Bryce, G. R. & Conlee, R. K. Adaptations to a high-fat diet that increase exercise endurance in male rats. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **56**, 78–83 (1984).
156. Nemeth, P. M., Rosser, B. W. C., Choksi, R. M., Norris, B. J. & Baker, K. M. Metabolic response to a high-fat diet in neonatal and adult rat muscle. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **262**, (1992).
157. Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. & Spiegelman, B. M. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12017–22 (2007).
158. Miller, B. F. & Hamilton, K. L. A perspective on the determination of mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **302**, E496–9 (2012).
159. Simopoulos, A. . The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* **56**, 365–379 (2002).
160. Simopoulos, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* **60**, 502–7 (2006).
161. Simopoulos, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. **233**, 674–88 (2008).
162. Simopoulos, A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 438–463 (1991).
163. Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F. & Rawlings, R. R. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 950–62 (2011).

164. Degirolamo, C., Kelley, K. L., Wilson, M. D. & Rudel, L. L. Dietary n-3 LCPUFA from fish oil but not alpha-linolenic acid-derived LCPUFA confers atheroprotection in mice. *J. Lipid Res.* **51**, 1897–905 (2010).
165. Iso, H. *et al.* Intake of fish and omega-3 fatty acids and risk of stroke in women. *J. Am. Med. Assoc.* **285**, 304–312 (2001).
166. Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C. & Meier, G. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.* **112**, 298–304 (2002).
167. Lemaitre, R. N. *et al.* n-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: The Cardiovascular Health Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 319–325 (2003).
168. Kris-Etherton, P. M. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* **106**, 2747–2757 (2002).
169. Marchioli, R. Early Protection Against Sudden Death by n-3 Polyunsaturated Fatty Acids After Myocardial Infarction: Time-Course Analysis of the Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* **105**, 1897–1903 (2002).
170. Block, R. C., Harris, W. S., Reid, K. J., Sands, S. A. & Spertus, J. A. EPA and DHA in blood cell membranes from acute coronary syndrome patients and controls. *Atherosclerosis* **197**, 821–8 (2008).
171. Miller, E. R. *et al.* The effects of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation on biomarkers of kidney injury in adults with diabetes: results of the GO-FISH trial. *Diabetes Care* **36**, 1462–9 (2013).
172. Wang, Q. *et al.* Effect of omega-3 fatty acids supplementation on endothelial function: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Atherosclerosis* **221**, 536–43 (2012).
173. Ruxton, C. H. S., Reed, S. C., Simpson, M. J. A. & Millington, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* **17**, 449–59 (2004).
174. O'Shea, K. M. *et al.* Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 819–27 (2009).
175. Schuchardt, J. P. *et al.* Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis.* **10**, 145 (2011).
176. Storlien, L. H. *et al.* Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and ω -3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**, 280–289 (1991).

177. Neschen, S. *et al.* n-3 Fatty acids preserve insulin sensitivity in vivo in a peroxisome proliferator-activated receptor- α -dependent manner. *Diabetes* **56**, 1034–41 (2007).
178. Oh, D. Y. *et al.* GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* **142**, 687–98 (2010).
179. Flachs, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia* **48**, 2365–75 (2005).
180. Pérez-Matute, P., Pérez-Echarri, N., Martínez, J. A., Martí, A. & Moreno-Aliaga, M. J. Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . *Br. J. Nutr.* **97**, 389–98 (2007).
181. Lombardo, Y. B., Hein, G. & Chicco, A. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids* **42**, 427–37 (2007).
182. Lombardo, Y. B. & Chicco, A. G. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 1–13 (2006).
183. Kuda, O. *et al.* n-3 Fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* **52**, 1455–1455 (2009).
184. Itariu, B. K. *et al.* Long-chain n 2 3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients□: a randomized. 1137–1149 (2013). doi:10.3945/ajcn.112.037432.1
185. Flachs, P. *et al.* Synergistic induction of lipid catabolism and anti-inflammatory lipids in white fat of dietary obese mice in response to calorie restriction and n-3 fatty acids. *Diabetologia* **54**, 2626–38 (2011).
186. Mori, T. a *et al.* Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 817–25 (1999).
187. Griffin, M. D. *et al.* Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: The OPTILIP study. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 1290–1298 (2006).
188. Giacco, R. *et al.* Fish oil, insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in healthy people: is there any effect of fish oil supplementation in relation to the type of background diet and habitual dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids? *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **17**, 572–80 (2007).
189. Itoh, M. *et al.* Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1918–25 (2007).

190. Ramel, A. *et al.* Beneficial effects of long-chain n-3 fatty acids included in an energy-restricted diet on insulin resistance in overweight and obese European young adults. *Diabetologia* **51**, 1261–8 (2008).
191. Krebs, J. D. *et al.* Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women. *Int. J. Obes. (Lond)*. **30**, 1535–44 (2006).
192. Jelenik, T. *et al.* AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetes* **59**, 2737–46 (2010).
193. Couet, C., Delarue, J., Ritz, P., Antoine, J. M. & Lamisse, F. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes.* **21**, 637–643 (1997).
194. Azain, M. J. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. in *J. Anim. Sci.* **82**, 916–924 (2004).
195. Lapillonne, A., Clarke, S. D. & Heird, W. C. Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 151–156 (2004).
196. Baillie, R. A., Takada, R., Nakamura, M. & Clarke, S. D. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* **60**, 351–356 (1999).
197. Jump, D. B. *et al.* Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J. Nutr.* **135**, 2503–2506 (2005).
198. Kalupahana, N. S. *et al.* Eicosapentaenoic acid prevents and reverses insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice via modulation of adipose tissue inflammation. *J. Nutr.* **140**, 1915–22 (2010).
199. Serhan, C. N. & Chiang, N. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br. J. Pharmacol.* **153 Suppl** , S200–15 (2008).
200. Vericel, E., Polette, A., Bacot, S., Calzada, C. & Lagarde, M. Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets. *J. Thromb. Haemost.* **1**, 566–572 (2003).
201. Guillot, N. *et al.* Increasing intakes of the long-chain omega-3 docosahexaenoic acid: effects on platelet functions and redox status in healthy men. *FASEB J.* **23**, 2909–16 (2009).
202. Feng, Z., Hu, W., Marnett, L. J. & Tang, M. Malondialdehyde, a major endogenous lipid peroxidation product, sensitizes human cells to UV- and BPDE-induced killing and mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair. *Mutat. Res.* **601**, 125–36 (2006).

203. Polidori*, M. C. *et al.* Elevated Lipid Peroxidation Biomarkers and Low Antioxidant Status in Atherosclerotic Patients with Increased Carotid or Iliofemoral Intima Media Thickness. *J. Investig. Med.* **55**, 163 (2007).
204. Armstrong, E. G. & Koffman, R. G. Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 731–737 (2000).
205. Méndez, L. *et al.* Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω 3 PUFAs. *Free Radic. Biol. Med.* **55**, 8–20 (2013).
206. Lai, Y. H. L. *et al.* Association of dietary omega-3 fatty acids with prevalence of metabolic syndrome: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Clin. Nutr.* **32**, 966–9 (2013).
207. Thomson, A. B. *et al.* Fish oil modifies effect of high cholesterol diet on intestinal absorption in diabetic rats. *Diabetes Res.* **22**, 171–183 (1993).
208. De Vogel-van den Bosch, H. M. *et al.* PPAR α -mediated effects of dietary lipids on intestinal barrier gene expression. *BMC Genomics* **9**, 231 (2008).
209. González-Pérez, A. *et al.* Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB J.* **23**, 1946–57 (2009).
210. Kopecky, J. *et al.* n-3 PUFA: bioavailability and modulation of adipose tissue function. *Proc. Nutr. Soc.* **68**, 361–9 (2009).
211. Jahangiri, A., Leifert, W. R., Kind, K. L. & McMurchie, E. J. Dietary fish oil alters cardiomyocyte Ca²⁺ dynamics and antioxidant status. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1592–602 (2006).
212. Lotito, S. B. & Frei, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med.* **41**, 1727–46 (2006).
213. Jump, D. B. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **277**, 8755–8 (2002).
214. Lionetti, L. *et al.* High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. *PLoS One* **9**, e92753 (2014).
215. Wu, S., Zhou, F., Zhang, Z. & Xing, D. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J.* **278**, 941–54 (2011).
216. Mudgil, D. & Barak, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review. *Int. J. Biol. Macromol.* **61**, 1–6 (2013).
217. McCleary, B. V. *et al.* Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber (CODEX definition) by enzymatic-gravimetric method and liquid chromatography: Collaborative study. *J. AOAC Int.* **95**, 824–844 (2012).

218. DeVries, J. W. *et al.* The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World* **46**, 112–129 (2001).
219. Slavin, J. Fiber and prebiotics: mechanisms and health benefits. *Nutrients* **5**, 1417–35 (2013).
220. EFSA Panel on Dietetic Products, N. and A. (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J.* **2010** **8**, (2010).
221. Papathanasopoulos, A. & Camilleri, M. Dietary fiber supplements: effects in obesity and metabolic syndrome and relationship to gastrointestinal functions. *Gastroenterology* **138**, 65–72.e1–2 (2010).
222. Suter, P. M. Carbohydrates and dietary fiber. *Handb. Exp. Pharmacol.* **170**, 231–261 (2005).
223. Ferguson, L. R., Chavan, R. R. & Harris, P. J. Changing Concepts of Dietary Fiber: Implications for Carcinogenesis. *Nutr. Cancer* **39**, 155–169 (2001).
224. Dietary Guidelines for Americans 2010 - DietaryGuidelines2010.pdf. at <<http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2010/DietaryGuidelines2010.pdf>>
225. Carlson, J. J., Eisenmann, J. C., Norman, G. J., Ortiz, K. A. & Young, P. C. Dietary fiber and nutrient density are inversely associated with the metabolic syndrome in US adolescents. *J. Am. Diet. Assoc.* **111**, 1688–95 (2011).
226. Jones, J. R., Lineback, D. M. & Levine, M. J. Dietary Reference Intakes: Implications for Fiber Labeling and Consumption: A Summary of the International Life Sciences Institute North America Fiber Workshop, June 1-2, 2004, Washington, DC. *Nutr. Rev.* **64**, 31–38 (2006).
227. Salmerón, J. *et al.* Dietary fiber, glycemic load, and risk of NIDDM in men. *Diabetes Care* **20**, 545–550 (1997).
228. Liu, S. *et al.* Whole grain consumption and risk of ischemic stroke in women: A prospective study. *J. Am. Med. Assoc.* **284**, 1534–1540 (2000).
229. Fung, T. T. *et al.* Whole-grain intake and the risk of type 2 diabetes: A prospective study in men. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 535–540 (2002).
230. Sierra, M., García, J. J., Fernández, N., Diez, M. J. & Calle, A. P. Therapeutic effects of psyllium in type 2 diabetic patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 830–42 (2002).
231. Lattimer, J. M. & Haub, M. D. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* **2**, 1266–89 (2010).
232. Eshak, E. S. *et al.* Dietary fiber intake is associated with reduced risk of mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women. *J. Nutr.* **140**, 1445–53 (2010).

233. Behall, K. M., Scholfield, D. J., Hallfrisch, J. G. & Liljeberg-Elmståhl, H. G. M. Consumption of both resistant starch and beta-glucan improves postprandial plasma glucose and insulin in women. *Diabetes Care* **29**, 976–81 (2006).
234. Raninen, K., Lappi, J., Mykkänen, H. & Poutanen, K. Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose. *Nutr. Rev.* **69**, 9–21 (2011).
235. Davy, B. M. & Melby, C. L. The effect of fiber-rich carbohydrates on features of Syndrome X. *J. Am. Diet. Assoc.* **103**, 86–96 (2003).
236. Venn, B. J. & Mann, J. I. Cereal grains, legumes and diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 1443–61 (2004).
237. Anderson, J. W., Randles, K. M., Kendall, C. W. C. & Jenkins, D. J. A. Carbohydrate and Fiber Recommendations for Individuals with Diabetes: A Quantitative Assessment and Meta-Analysis of the Evidence. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 5–17 (2004).
238. Delzenne, N. M. & Cani, P. D. A place for dietary fibre in the management of the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **8**, 636–640 (2005).
239. Lairon, D. *et al.* Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 1185–1194 (2005).
240. Galisteo, M. *et al.* Plantago ovata husks-supplemented diet ameliorates metabolic alterations in obese Zucker rats through activation of AMP-activated protein kinase. Comparative study with other dietary fibers. *Clin. Nutr.* **29**, 261–7 (2010).
241. Ma, Y. *et al.* Association between dietary fiber and serum C-reactive protein. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 760–766 (2006).
242. Ma, Y. *et al.* Association between dietary fiber and markers of systemic inflammation in the Women's Health Initiative Observational Study. *Nutrition* **24**, 941–9 (2008).
243. Johansson-Persson, A. *et al.* A high intake of dietary fiber influences C-reactive protein and fibrinogen, but not glucose and lipid metabolism, in mildly hypercholesterolemic subjects. *Eur. J. Nutr.* **53**, 39–48 (2014).
244. Gallaher, C. M., Munion, J., Hesslink, R., Wise, J. & Gallaher, D. D. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion in rats. *J. Nutr.* **130**, 2753–2759 (2000).
245. Galisteo, M. *et al.* A diet supplemented with husks of Plantago ovata reduces the development of endothelial dysfunction, hypertension, and obesity by affecting adiponectin and TNF- α in Zucker rats. *J. Nutr.* **135**, 2399–2404 (2005).
246. Anderson, J. W., Allgood, L. D., Turner, J., Oeltgen, P. R. & Daggy, B. P. Effects of psyllium on glucose and serum lipid responses in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 466–473 (1999).

247. Fernandez, M.-L. Soluble fiber and nondigestible carbohydrate effects on plasma lipids and cardiovascular risk. *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 35–40 (2001).
248. Lau, C. *et al.* Dietary Glycemic Index, Glycemic Load, Fiber, Simple Sugars, and Insulin Resistance: The Inter99 study. *Diabetes Care* **28**, 1397–1403 (2005).
249. Pi-Sunyer, X. Do Glycemic Index, Glycemic Load, and Fiber Play a Role in Insulin Sensitivity, Disposition Index, and Type 2 Diabetes? *Diabetes Care* **28**, 2978–2979 (2005).
250. Weickert, M. O. *et al.* Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care* **29**, 775–780 (2006).
251. Lutsey, P. L. *et al.* Whole grain intake and its cross-sectional association with obesity, insulin resistance, inflammation, diabetes and subclinical CVD: The MESA Study. *Br. J. Nutr.* **98**, 397–405 (2007).
252. McKeown, N. M. *et al.* Carbohydrate Nutrition, Insulin Resistance, and the Prevalence of the Metabolic Syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care* **27**, 538–546 (2004).
253. Ylonen, K. *et al.* Associations of Dietary Fiber With Glucose Metabolism in Nondiabetic Relatives of Subjects With Type 2 Diabetes: The Botnia Dietary Study. *Diabetes Care* **26**, 1979–1985 (2003).
254. Lovejoy, J. & DiGirolamo, M. Habitual dietary intake and insulin sensitivity in lean and obese adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**, 1174–1179 (1992).
255. Rave, K., Roggen, K., Dellweg, S., Heise, T. & tom Dieck, H. Improvement of insulin resistance after diet with a whole-grain based dietary product: results of a randomized, controlled cross-over study in obese subjects with elevated fasting blood glucose. *Br. J. Nutr.* **98**, 929–36 (2007).
256. Hallfrisch, J., Scholfield, D. J. & Behall, K. M. Diets containing soluble oat extracts improve glucose and insulin responses of moderately hypercholesterolemic men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 379–384 (1995).
257. Marshall, J. A., Bessesen, D. H. & Hamman, R. F. High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: the San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia* **40**, 430–8 (1997).
258. Ludwig, D. S. Dietary Fiber, Weight Gain, and Cardiovascular Disease Risk Factors in Young Adults. *JAMA* **282**, 1539 (1999).
259. Breneman, C. B. & Tucker, L. Dietary fibre consumption and insulin resistance - the role of body fat and physical activity. *Br. J. Nutr.* **110**, 375–83 (2013).
260. Vuksan, V. *et al.* Beneficial effects of viscous dietary fiber from Konjac-Mannan in subjects with the insulin resistance syndrome: Results of a controlled metabolic trial. *Diabetes Care* **23**, 9–14 (2000).

261. Juntunen, K. S., Laaksonen, D. E., Poutanen, K. S., Niskanen, L. K. & Mykkänen, H. M. High-fiber rye bread and insulin secretion and sensitivity in healthy postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 385–391 (2003).
262. Pereira, M. A. *et al.* Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **75**, 848–855 (2002).
263. Jang, Y., Jong, H. L., Oh, Y. K., Hyun, Y. P. & Sang, Y. L. Consumption of whole grain and legume powder reduces insulin demand, lipid peroxidation, and plasma homocysteine concentrations in patients with coronary artery disease: Randomized controlled clinical trial. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 2065–2071 (2001).
264. Ziai, S. A. *et al.* Psyllium decreased serum glucose and glycosylated hemoglobin significantly in diabetic outpatients. *J. Ethnopharmacol.* **102**, 202–7 (2005).
265. Rodríguez-Morán, M., Guerrero-Romero, F. & Lazcano-Burciaga, G. Lipid- and Glucose-Lowering Efficacy of Plantago Psyllium in Type II Diabetes. *J. Diabetes Complications* **12**, 273–278 (1998).
266. Ushida, K., Hatanaka, H., Inoue, R., Tsukahara, T. & Phillips, G. O. Effect of long term ingestion of gum arabic on the adipose tissues of female mice. *Food Hydrocoll.* **25**, 1344–1349 (2011).
267. Jiménez-Escrig, A., Tenorio, M. D., Espinosa-Martos, I. & Rupérez, P. Health-promoting effects of a dietary fiber concentrate from the soybean byproduct okara in rats. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7495–501 (2008).
268. Artiss, J. D., Brogan, K., Brucal, M., Moghaddam, M. & Jen, K.-L. C. The effects of a new soluble dietary fiber on weight gain and selected blood parameters in rats. *Metabolism.* **55**, 195–202 (2006).
269. Choi, J. S., Kim, H., Jung, M. H., Hong, S. & Song, J. Consumption of barley beta-glucan ameliorates fatty liver and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **54**, 1004–13 (2010).
270. Bartley, G. E. *et al.* Hypocholesterolemic effects of hydroxypropyl methylcellulose are mediated by altered gene expression in hepatic bile and cholesterol pathways of male hamsters. *J. Nutr.* **140**, 1255–60 (2010).
271. Reimer, R. A. *et al.* The soluble fiber complex PolyGlycopleX lowers serum triglycerides and reduces hepatic steatosis in high-sucrose-fed rats. *Nutr. Res.* **31**, 296–301 (2011).
272. Du, H. *et al.* Dietary fiber and subsequent changes in body weight and waist circumference in European men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 329–36 (2010).
273. Tucker, L. A. & Thomas, K. S. Increasing total fiber intake reduces risk of weight and fat gains in women. *J. Nutr.* **139**, 576–81 (2009).

274. Liu, S. *et al.* Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**, 920–927 (2003).
275. Campagnolo, P. D. B., Vitolo, M. R., Gama, C. M. & Stein, A. T. Prevalence of overweight and associated factors in southern Brazilian adolescents. *Public Health* **122**, 509–15 (2008).
276. Slavin, J. L. Dietary fiber and body weight. *Nutrition* **21**, 411–8 (2005).
277. Jenkins, D. J. A. *et al.* Dietary fibre, lente carbohydrates and the insulin-resistant diseases. in *Br. J. Nutr.* **83**, (2000).
278. Kimmel, S. E., Michel, K. E., Hess, R. S. & Ward, C. R. Effects of insoluble and soluble dietary fiber on glycemic control in dogs with naturally occurring insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **216**, 1076–1081 (2000).
279. Li, J. *et al.* Long-term effects of high dietary fiber intake on glucose tolerance and lipid metabolism in GK rats: comparison among barley, rice, and cornstarch. *Metabolism* **52**, 1206–1210 (2003).
280. Lairon, D., Play, B. & Jourdheuil-Rahmani, D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 217–27 (2007).
281. Anderson, J. W. & Chen, W. J. L. Plant fiber. Carbohydrate and lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 346–363 (1979).
282. Grube, B., Chong, P.-W., Lau, K.-Z. & Orzechowski, H.-D. A Natural Fiber Complex Reduces Body Weight in the Overweight and Obese: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Obesity* **21**, 58–64 (2012).
283. Pereira, M. A. & Ludwig, D. S. Dietary fiber and body-weight regulation: Observations and mechanisms. *Pediatr. Clin. North Am.* **48**, 969–980 (2001).
284. Holt, S., Brand, J., Soveny, C. & Hansky, J. Relationship of satiety to postprandial glycaemic, insulin and cholecystokinin responses. *Appetite* **18**, 129–141 (1992).
285. Bourdon, I. *et al.* Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with β -glucan. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**, 55–63 (1999).
286. Liddle, R. A. Cholecystokinin cells. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 221–42 (1997).
287. Cani, P. D., Dewever, C. & Delzenne, N. M. Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. *Br. J. Nutr.* **92**, 521 (2007).
288. Galisteo, M., Duarte, J. & Zarzuelo, A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome □. **19**, 71–84 (2008).

289. Jakobsdottir, G., Jädert, C., Holm, L. & Nyman, M. E. Propionic and butyric acids, formed in the caecum of rats fed highly fermentable dietary fibre, are reflected in portal and aortic serum. *Br. J. Nutr.* **110**, 1565–72 (2013).
290. Nilsson, A. C., Östman, E. M., Knudsen, K. E. B., Holst, J. J. & Björck, I. M. E. A cereal-based evening meal rich in indigestible carbohydrates increases plasma butyrate the next morning. *J. Nutr.* **140**, 1932–6 (2010).
291. Zoran, D. L., Turner, N. D., Taddeo, S. S., Chapkin, R. S. & Lupton, J. R. Wheat bran diet reduces tumor incidence in a rat model of colon cancer independent of effects on distal luminal butyrate concentrations. *J. Nutr.* **127**, 2217–2225 (1997).
292. Marcil, V., Delvin, E., Garofalo, C. & Levy, E. Butyrate impairs lipid transport by inhibiting microsomal triglyceride transfer protein in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **133**, 2180–2183 (2003).
293. Marcil, V. *et al.* Modulation of lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly by butyrate. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **283**, (2002).
294. Gao, Z. *et al.* Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. **58**, (2009).
295. Hu, G.-X., Chen, G.-R., Xu, H., Ge, R.-S. & Lin, J. Activation of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome. *Med. Hypotheses* **74**, 123–6 (2010).
296. Islam, A., Civitarese, A. E., Hesslink, R. L. & Gallaher, D. D. Viscous dietary fiber reduces adiposity and plasma leptin and increases muscle expression of fat oxidation genes in rats. *Obesity (Silver Spring)*. **20**, 349–55 (2012).
297. Ludvik, B., Nolan, J. J., Baloga, J., Sacks, D. & Olefsky, J. Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM. *Diabetes* **44**, 1121–1125 (1995).
298. Galisteo, M., Duarte, J. & Zarzuelo, A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. *J. Nutr. Biochem.* **19**, 71–84 (2008).
299. Cooper, S. A. *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2009–23 (2007).
300. FDA Talk Paper: Health Claim for Soy Protein and Coronary Heart Disease. at <<http://www.starlitecuisine.com/news-a-info/26-fda-talk-paper-health-claim-for-soy-protein-and-coronary-heart-disease>>
301. Zhan, S. & Ho, S. C. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 397–408 (2005).
302. Bairey Merz, C. N. *et al.* Phytoestrogens and lipoproteins in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **91**, 2209–13 (2006).

303. Miraghajani, M. S. & Azadbakht, L. Can soy products affect on inflammation level? A review on the current evidence. *J. Isfahan Med. Sch.* **29**, (2011).
304. Messina, M., Ho, S. & Alekel, D. L. Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 649–658 (2004).
305. Howes, L. G., Howes, J. B. & Knight, D. C. Isoflavone therapy for menopausal flushes: a systematic review and meta-analysis. *Maturitas* **55**, 203–11 (2006).
306. Zhao, Y., Pan, J. H. & Zhang, L. L. Soy foods intake in adolescence and the risk of breast cancer: A systematic review. *Chinese J. Evidence-Based Med.* **12**, 550–556 (2012).
307. Trock, B. J., Hilakivi-Clarke, L. & Clarke, R. Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**, 459–71 (2006).
308. Yan, L. & Spitznagel, E. L. Meta-analysis of soy food and risk of prostate cancer in men. *Int. J. Cancer* **117**, 667–9 (2005).
309. Ascencio, C. *et al.* Soy Protein Affects Serum Insulin and Hepatic SREBP-1 mRNA and Reduces Fatty Liver in Rats. *J. Nutr.* **134**, 522–529 (2004).
310. Bartke, A. *et al.* Effects of Soy-derived diets on plasma and liver lipids, glucose tolerance, and longevity in normal, long-lived and short-lived mice. *Horm. Metab. Res.* **36**, 550–8 (2004).
311. Lavigne, C., Marette, A. & Jacques, H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **278**, (2000).
312. Lu, M.-P. *et al.* Dietary soy isoflavones increase insulin secretion and prevent the development of diabetic cataracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutr. Res.* **28**, 464–71 (2008).
313. Villegas, R. *et al.* Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai women's health study. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 162–167 (2008).
314. Goodman-Gruen, D. & Kritz-Silverstein, D. Usual dietary isoflavone intake is associated with cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women. *J. Nutr.* **131**, 1202–1206 (2001).
315. Yang, G. *et al.* Soyfood consumption and risk of glycosuria: a cross-sectional study within the Shanghai Women's Health Study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **58**, 615–20 (2004).
316. Nanri, A. *et al.* Soy product and isoflavone intakes are associated with a lower risk of type 2 diabetes in overweight Japanese women. *J. Nutr.* **140**, 580–6 (2010).

317. Liu, Z.-M., Chen, Y.-M. & Ho, S. C. Effects of soy intake on glycemic control: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 1092–101 (2011).
318. Serrano, J. C. E. *et al.* Vitamin D receptor Bsm1 polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr.* **8**, 561–9 (2013).
319. Vedavanam, K., Sriyayanta, S., O'Reilly, J., Raman, A. & Wiseman, H. Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soyabean phytochemical extract (SPE). *Phytother. Res.* **13**, 601–8 (1999).
320. Akiyama, T. *et al.* Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* **262**, 5592–5595 (1987).
321. Cederroth, C. R. *et al.* Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes* **57**, 1176–85 (2008).
322. Rasbach, K. A. & Schnellmann, R. G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **325**, 536–43 (2008).
323. Tovar, A. R. *et al.* Soy protein reduces hepatic lipotoxicity in hyperinsulinemic obese Zucker fa/fa rats. *J. Lipid Res.* **46**, 1823–32 (2005).
324. Vega-López, S. *et al.* Plasma antioxidant capacity in response to diets high in soy or animal protein with or without isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 43–49 (2005).
325. Bakhtiary, A. *et al.* Evaluation of the oxidative stress and glycemic control status in response to soy in older women with the metabolic syndrome. *Iran. Red Crescent Med. J.* **13**, 795–804 (2011).
326. Engelman, H. M., Alekel, D. L., Hanson, L. N., Kanthasamy, A. G. & Reddy, M. B. Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 590–596 (2005).
327. Wiseman, H. *et al.* Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 395–400 (2000).
328. Esteves, E. A., Martino, H. S. D., Oliveira, F. C. E., Bressan, J. & Costa, N. M. B. Chemical composition of a soybean cultivar lacking lipoxygenases (LOX2 and LOX3). *Food Chem.* **122**, 238–242 (2010).
329. Andrade, G. F. *et al.* The addition of whole soy flour to cafeteria diet reduces metabolic risk markers in wistar rats. *Lipids Health Dis.* **12**, 145 (2013).
330. Heneman, K. M., Chang, H. C., Prior, R. L. & Steinberg, F. M. Soy protein with and without isoflavones fails to substantially increase postprandial antioxidant capacity. *J. Nutr. Biochem.* **18**, 46–53 (2007).

331. Cederroth, C. R. & Nef, S. Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**, 30–42 (2009).
332. Aoyama, T. *et al.* Effect of Soy and Milk Whey Protein Isolates and Their Hydrolysates on Weight Reduction in Genetically Obese Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 2594–2600 (2000).
333. Anderson, J. W., Fuller, J., Patterson, K., Blair, R. & Tabor, A. Soy compared to casein meal replacement shakes with energy-restricted diets for obese women: randomized controlled trial. *Metabolism.* **56**, 280–8 (2007).
334. Berger, P. K. *et al.* Weight gain in college females is not prevented by isoflavone-rich soy protein: a randomized controlled trial. *Nutr. Res.* **34**, 66–73 (2014).
335. Chen, J. & Liu, X. Effects on blood fat and bone density of postmenopausal women fed by soy protein with isoflavone. *Natl. Med. J. China* **94**, 215–217 (2014).
336. Hermansen, K. *et al.* Effects of soy supplementation on blood lipids and arterial function in hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **59**, 843–50 (2005).
337. Zhang, Y. B. *et al.* Effect of Soy Isoflavone Crude Extract Supplementation on High Fat Diet-induced Insulin Resistance in Ovariectomized Rats. *Biomed. Environ. Sci.* **27**, 49–51 (2014).
338. Swain, J. H., Lee Alekel, D., Dent, S. B., Peterson, C. T. & Ready, M. B. Iron indexes and total antioxidant status in response to soy protein intake in perimenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 165–171 (2002).
339. Bhathena, S. J., Ali, A. A., Mohamed, A. I., Hansen, C. T. & Velasquez, M. T. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. *J. Nutr. Biochem.* **13**, 684–689 (2002).
340. Garrel, D. R. *et al.* Milk- and soy-protein ingestion: Acute effect on serum uric acid concentration. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**, 665–669 (1991).
341. Hanhineva, K. *et al.* Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 1365–402 (2010).
342. Rüegg, J. *et al.* Epigenetic regulation of glucose transporter 4 by estrogen receptor β . *Mol. Endocrinol.* **25**, 2017–28 (2011).
343. Gorres, B. K., Bomhoff, G. L., Gupte, A. A. & Geiger, P. C. Altered estrogen receptor expression in skeletal muscle and adipose tissue of female rats fed a high-fat diet. *J. Appl. Physiol.* **110**, 1046–53 (2011).
344. Seo, D.-B., Jeong, H. W., Lee, S.-J. & Lee, S.-J. Coumestrol Induces Mitochondrial Biogenesis by Activating Sirt1 in Cultured Skeletal Muscle Cells. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 4298–4305 (2014).

345. Damsgaard, C. T. *et al.* n-3 PUFA status in school children is associated with beneficial lipid profile, reduced physical activity and increased blood pressure in boys. *Br. J. Nutr.* **110**, 1304–12 (2013).
346. Zaki, M. E., Mohamed, S. K., Bahgat, K. A.-E. & Kholoussi, S. M. Metabolic syndrome components in obese Egyptian children. *Ann. Saudi Med.* **32**, 603–10 (2012).
347. Feldeisen, S. E. & Tucker, K. L. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 46–60 (2007).
348. Jans, A. *et al.* Impact of dietary fat quantity and quality on skeletal muscle fatty acid metabolism in subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism*. **61**, 1554–65 (2012).
349. Babio, N., Bulló, M. & Salas-Salvadó, J. Mediterranean diet and metabolic syndrome: the evidence. *Public Health Nutr.* **12**, 1607–17 (2009).
350. Kiortsis, D. N. & Simos, Y. V. Mediterranean diet for the prevention and treatment of metabolic syndrome: is it worth it? *Angiology* **65**, 5–8 (2014).
351. Prevalence of the metabolic syndrome in populations of Asian origin. Comparison of the IDF definition with the NCEP definition. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **76**, 57–67 (2007).
352. Kuroki, Y., Kanauchi, K. & Kanauchi, M. Adherence index to the American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendation is associated with the metabolic syndrome in Japanese male workers. *Eur. J. Intern. Med.* **23**, e199–203 (2012).
353. Ochner, C. N., Barrios, D. M., Lee, C. D. & Pi-Sunyer, F. X. Biological mechanisms that promote weight regain following weight loss in obese humans. *Physiol. Behav.* **120**, 106–13 (2013).
354. Hill, N. R., Levy, J. C. & Matthews, D. R. Expansion of the homeostasis model assessment of β -cell function and insulin resistance to enable clinical trial outcome modeling through the interactive adjustment of physiology and treatment effects: iHOMA2. *Diabetes Care* **36**, 2324–30 (2013).